RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG UND PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE ADENOSIN-3', 5'-MONOPHOSPHAT UND GUANOSIN-3', 5'-MONOPHOSPHAT IN ISOLIERTEN ZELLEN AUS DER MAGENSCHLEIMHAUT DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HANS-KARL HEIM
aus Weil im Schönbuch

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0022

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG UND PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE ADENOSIN-3', 5'-MONOPHOSPHAT UND GUANOSIN-3', 5'-MONOPHOSPHAT IN ISOLIERTEN ZELLEN AUS DER MAGENSCHLEIMHAUT DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HANS-KARL HEIM
aus Weil im Schönbuch

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 1984

Dekan: Professor Dr. K.-A. Kovar

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Ruoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.P.T. Ammon

Die vorliegende Arbeit wurde im Dezember 1979 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.- J. Ruoff am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Juli 1984 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.- J. Ruoff danke ich für die überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und sein allzeitiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts Herrn Beer, Herrn Trautmann, Herrn Müh, Fräulein Delabar, Frau Maier und Frau Frisch möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt weiterhin Christiane, für ihre tatkräftige Unterstützung, Herrn Dr. Mau, Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen, für seine Anregungen zur statistischen Auswertung und der Arbeitsgruppe von Prof. J. Schultz, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, für die gute Zusammenarbeit bei der Jodierung.

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsübersicht

Abkürzungen

A Einleitung und Fragestellung

B Ausarbeitung eines radioimmunologischen cAMP- und cGMP-Assays

C Überprüfung der Messwerte - RIA-Qualitätskontrolle

D Isolierung und Inkubation von Magenschleimhautzellen der Ratte

E Verwendete Substanzen und Geräte

F Einfluß von Pharmaka auf den cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte

G Diskussion der radioimmunologischen Methodik

H Diskussion der pharmakologischen Beeinflußung der cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte

I Zusammenfassung

K Literaturverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

A	Einleitung und Fragestellung	1
B	Ausarbeitung eines radioimmunologischen cAMP- und cGMP-Assays	4
B.1	Antisera-Gewinnung	4
B.1.1	Präparation der Antigene	4
B.1.1.1	Koppelung von ScAMP bzw ScGMP an HSA	4
B.1.1.2	Überprüfung der Reaktionsprodukte	5
B.1.2	Immunisierung	5
B.1.3	Blutabnahme und Weiterverarbeitung	6
B.1.4	Prüfung der Antisera	7
B.1.4.1	Bindung der radioaktiv markierten Haptene	7
B.1.4.1.1	Im Verlauf der Immunisierung erzielte Antikörper-Titer	7
B.1.4.1.2	Einfluß der Serumverdünnung	8
B.1.4.2	Spezifität der Antisera	9
B.1.4.2.1	Spezifität gegen andere Nukleotide und Nukleoside	9
B.1.4.2.2	Prüfung der Spezifität der Antisera durch Messung von cAMP- und cGMP-Gewebespiegeln	12
B.1.4.2.3	Spezifität gegen Succinat	13
B.1.4.3	Empfindlichkeit der Antisera	14
B.2	Präparation der radioaktiv markierten Haptene	16
B.2.1	Jodierung von ScAMP-TME bzw ScGMP-TME - Reinigung der Reaktionsprodukte	16
B.2.2	Verdünnung für den RIA	16
B.3	Extraktion der cyclischen Nukleotide	17
B.3.1	Recovery von cAMP	17
B.3.2	Einfluß der Extraktionsdauer	18
B.4	Abtrennung störender Substanzen	19
B.4.1	Abtrennung durch Co-Präzipitation mit Bariumsulfat	19

B.4.2	Abtrennung durch Behandlung mit Aluminiumoxid im Batch- Verfahren	20
B.4.2.1	Recovery der cyclischen Nukleotide	21
B.4.2.2	Abtrennung störender Nukleotide	22
B.4.2.3	Einfluß der Aluminiumoxid-Menge	22
B.4.2.4	Zusätzliche Lyophilisation der Proben	23
B.5	Succinylierung	24
B.5.1	Lyophilisation von Bernsteinsäureanhydrid	24
B.5.2	Ausbeute der Succinylierung	24
B.5.2.1	Einfluß des pH-Wertes	24
B.6	RIA	26
B.6.1	Kinetik der Hapten-Antikörper-Reaktion	27
B.6.2	Einfluß der Kammer- und Membranvorbehandlung	28
B.7	Versuchsauswertung	28
B.7.1	Berechnung der gebundenen Radioaktivität	28
B.7.2	Berechnung der Ergebnisse des RIA	28
B.7.3	Statistische Auswertung	29
B.8	Behandlung der Standards	29
B.9	Zusammenfassende Vorschriften für die Durchführung des cAMP- und cGMP-Assays	30
B.9.1	Aluminiumoxid-Methode	30
B.9.1.1	Vorbereitungen	30
B.9.1.2	Durchführung	31
B.9.2	Methode nach Delaage et al (91)	33
C	Überprüfung der Messwerte	34
C.1	Messung bei verschiedenen Zellkonzentrationen	34
C.2	Recovery von cGMP	35
C.3	Phosphodiesterase-Versuche	35
C.4	RIA-Qualitätskontrolle	35

C.5 Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Literaturwerten 38

D Isolierung und Inkubation von Magenschleimhautzellen der Ratte 41

D.1 Zellisolierung 41

D.2 Auftrennung des Zellgemisches in Fraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes 41

D.3 Inkubation der Zellen 42
D.3.1 Inkubation isolierter Zellen des Zellgemisches 42
D.3.1.1 Standard-Vorschrift 42
D.3.1.2 Testung Rezeptor-blockierender Substanzen 42
D.3.2 Inkubation isolierter Zellen der einzelnen Zellfraktionen 42
D.3.3 Herstellung der Testlösungen 42

E Verwendete Substanzen und Geräte 43

E.1 Verwendete Substanzen 43

E.2 Verwendete Geräte 45

F Einfluß von Pharmaka auf den cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte 46

F.1 Basale cAMP- und cGMP-Spiegel 46
F.1.1 Einfluß von Bestandteilen des Standardpuffers 48
F.1.1.1 HEPES 48
F.1.1.2 Calcium und Magnesium 48
F.1.1.3 Kalium 48

F.2 Extrazelluläres cAMP und cGMP 49

F.3 Phosphodiesterase-Hemmstoffe 50
F.3.1 IBMX 50
F.3.2 Vergleich IBMX - Theophyllin 51

F.4	Histamin	53
F.4.1	Einfluß von Histamin auf das Zellgemisch	53
F.4.1.1	Interaktion Histamin - Somatostatin	54
F.4.1.2	Interaktion Histamin - PGE_2	55
F.4.1.3	Interaktion Histamin - Ethanol	56
F.4.1.4	Interaktion Histamin - Antihistaminika	56
F.4.2	Einfluß von Histamin auf einzelne Zellfraktionen	57
F.4.2.1	Interaktion Histamin - andere Substanzen in der PZ-Fraktion	59
F.5	Cholinerge Substanzen	61
F.5.1	Einfluß cholinerger Substanzen auf das Zellgemisch	61
F.5.1.1	Carbachol	61
F.5.1.2	Pilocarpin und Acetylcholin	63
F.5.1.3	Interaktion Carbachol - DTT	63
F.5.1.4	Interaktion Carbachol - Calcium	64
F.5.2	Einfluß cholinerger Substanzen auf einzelne Zellfraktionen	64
F.6	Pentagastrin	66
F.6.1	Einfluß von Pentagastrin auf das Zellgemisch	66
F.6.2	Einfluß von Pentagastrin auf einzelne Zellfraktionen	66
F.7	Adrenerge Substanzen	68
F.7.1	Einfluß adrenerger Substanzen auf das Zellgemisch	68
F.7.1.1	Substanzen mit vorwiegend α-sympathomimetischer Wirkung: Phenylephrin, Noradrenalin und Naphazolin	68
F.7.1.2	Substanzen mit vorwiegend ß-sympathomimetischer Wirkung: Adrenalin und Hexoprenalin	71
F.7.1.3	Substanzen mit vorwiegend indirekt sympathomimetischer Wirkung: Ephedrin	73
F.7.1.4	Interaktion adrenerge Substanzen - adrenerge Rezeptorenblocker	73
F.7.1.4.1	Einfluß adrenerger Rezeptorenblocker auf basale cAMP- und cGMP-Spiegel	73
F.7.1.4.2	Interaktion Adrenalin - adrenerge Rezeptorenblocker	73
F.7.1.4.3	Interaktion Noradrenalin - Phentolamin	74
F.7.1.5	Interaktion Adrenalin - DTT	75
F.7.1.6	Interaktion Adrenalin - Calcium	76
F.7.2	Einfluß von Adrenalin auf einzelne Zellfraktionen	78

F.8	Prostaglandine und Vorstufen	80
F.8.1	Einfluß von Prostaglandinen und Vorstufen auf das Zellgemisch	80
F.8.1.1	PGE_2	80
F.8.1.2	PGF_2 und Arachidonsäure	81
F.8.2	Einfluß von PGE_2 auf einzelne Zellfraktionen	81
F.9	Stoffe, die zur Bildung von NO führen können	83
F.10	Thiole und andere reduzierend oder oxidierend wirkende Substanzen	85
F.10.1	DTT	85
F.10.2	L-Cystein und 2-Mercaptoethanol	86
F.10.3	Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid	87
F.11	Nicht-steroidale Antirheumatika	87
F.12	Trijodthyronin und Calcitonin	87
F.13	Pankreashormone	89
F.14	Gastrointestinale Hormone	89
F.15	Forskolin	90
F.15.1	Einfluß von Forskolin auf das Zellgemisch	90
F.15.2	Einfluß von Forskolin auf einzelne Zellfraktionen	91
F.16	Ethanol	91
F.17	Andere Substanzen	92
F.18	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	92
G	Diskussion der radioimmunologischen Methodik	95
G.1	Antisera-Gewinnung	95
G.1.1	Präparation der Antigene	95
G.1.2	Prüfung der Antisera	95
G.2	Präparation der radioaktiv markierten Haptene	97

G.3	Extraktion der cyclischen Nukleotide	98
G.4	Abtrennung störender Substanzen durch Aluminiumoxid	98
G.5	Succinylierung	100
G.6	RIA-Puffer	101
G.7	Trennung von freier und gebundener Aktivität	102
G.8	Überprüfung der im cAMP- und cGMP-Assay erhaltenen Messwerte - Qualitätskontrolle	102
H	Diskussion der pharmakologischen Beeinflussung der cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte	103
H.1	Einleitung	103
H.2	Extrazelluläres cAMP und cGMP	105
H.3	Phosphodiesterase-Hemmstoffe	105
H.4	Histamin	106
H.4.1	Interaktion Histamin - Antihistaminika	108
H.4.2	Interaktion Histamin - Somatostatin	110
H.4.3	Interaktion Histamin - PGE_2	111
H.4.4	Interaktion Histamin - Ethanol	113
H.4.5	Interaktion Histamin - andere Substanzen	114
H.5	Cholinerge Substanzen	115
H.6	Pentagastrin	117
H.7	Adrenerge Substanzen	119
H.7.1	Adrenerge Agonisten	119
H.7.2	Adrenerge Rezeptorenblocker	122
H.8	Prostaglandine und Präkursoren	123

H.9	Stoffe, die zur Bildung von NO führen können	124
H.10	Thiole	124
H.10.1	Interaktion DTT - andere Substanzen	125
H.11	Nicht-steroidale Antirheumatika	125
H.12	Trijodthyronin und Calcitonin	126
H.13	Pankreas-Hormone	127
H.14	Gastrointestinale Hormone	128
H.15	Forskolin	129
H.16	Calcium	130
H.16.1	Interaktion Calcium - andere Substanzen	130
H.17	Andere Substanzen	131
H.18	Schlußfolgerungen	134
I	Zusammenfassung	136
K	Literaturverzeichnis	138

Abkürzungen

Abb	= Abbildung
AC	= Adenylatcyclase EC 4.6.1.1
AcAMP	= 2'-O-Acetyl-adenosin-3',5'-monophosphat
AcGMP	= 2'-O-Acetyl-guanosin-3',5'-monophosphat
ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
Al_2O_3	= Aluminiumoxid
AMP	= Adenosin-5'-monophosphat
AS	= Antiserum
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
BA	= Bernsteinsäureanhydrid
cAMP	= Adenosin-3',5'-monophosphat, cyclisch
cGMP	= Guanosin-3',5'-monophosphat, cyclisch
CP	= Citrat-Puffer 100mmol/l pH6,2 + Natriumazid 50mg/l
cpm	= counts pro Minute
DTT	= 1,4-Dithiothreitol
E	= Anzahl der separat durchgeführten Experimente
EC_{50}	= Substanz-Konzentration, die 50% der maximal erreichbaren Wirkung auslöst
Effekt	= Differenz (Messwert mit Testsubstanz) - (Messwert ohne Testsubstanz)
GC	= Guanylatcyclase EC 4.6.1.2
GMP	= Guanosin-5'-monophosphat
G-t	= Student's t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten, zweiseitig (Gruppen t-Test)
GTP	= Guanosin-5'-triphosphat
$HClO_4$	= Perchlorsäure
HEPES	= N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethan-sulfonsäure
Hrsg	= Herausgeber
HSA	= Albumin aus Humanserum
IBMX	= 3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC_{50}	= Inhibitor-Konzentration, die eine 50%ige Hemmung bewirkt
ID	= Isolierte Magenschleimhautdrüsen
Ink-D	= Inkubations-Dauer
Ink-M	= Inkubations-Medium
IZ	= Isolierte Magenschleimhautzellen

J-ScAMP-TME = ^{125}J-2'-O-Succinyl-adenosin-3',5'-monophosphat-tyrosin-methylester

J-ScGMP-TME = ^{125}J-2'-O-Succinyl-guanosin-3',5'-monophosphat-tyrosin-methylester

k = Korrelationskoeffizient

K = Kontrolle

Kap = Kapitel

K_2CO_3 = Kaliumcarbonat

KOH = Kaliumhydroxid

Leg = Legende

Lsg = Lösung

Meer-S = Meerschweinchen

M-Fraktion = Mittlere Fraktion s. Kap D.2

n = Anzahl der Messwerte

n.s = nicht signifikant

NO = Stickstoffoxid

p = Signifikanzniveau

Parallel-Versuch = cAMP- und cGMP-Messwert wurden in der gleichen Probe bestimmt

PZ = Parietalzelle

PZ-Fraktion = PZ-angereicherte Fraktion s. Kap D.2

RIA = Radioimmunoassay

rmH = radioaktiv markiertes Hapten

ScAMP = 2'-O-Succinyl-adenosin-3',5'-monophosphat

ScAMP-TME = 2'-O-Succinyl-adenosin-3',5'-monophosphat-tyrosin-methylester

ScGMP = 2'-O-Succinyl-guanosin-3',5'-monophosphat

ScGMP-TME = 2'-O-Succinyl-guanosin-3',5'-monophosphat-tyrosin-methylester

S-P = Signifikanzprüfung

SP = Standardpuffer s. Kap D.1

Tb = Tabelle

U-Fraktion = Untere Fraktion s. Kap D.2

V = Varianzanalyse

Verd = Verdünnung

* = $p<0,05$

** = $p<0,01$

*** = $p<0,001$

**** = $p<0,0001$

A Einleitung und Fragestellung

Schon bald nach der Entdeckung des cAMP im Lebergewebe [1957 (255)] und der Charakterisierung seiner Synthese durch die AC [1962 (353)], wurde seine Bedeutung als "second messenger" [Definition s. (352)] für die Wirkung hormoneller Substanzen erkannt [übersicht bei (235, 236)]. Im Prinzip wird dabei durch Bindung eines "first messenger" (Hormon, Pharmakon) an einen spezifischen zellmembranständigen Rezeptor, unter Beteiligung eines GTP-abhängigen Regulatorproteins, eine Aktivierung der ebenfalls membranständigen katalytischen Komponente der AC bewirkt und die Bildung von cAMP aus ATP stimuliert. Dieser "second messenger" führt dann zur Aktivierung spezieller cAMP-abhängiger Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung die Aktivität verschiedener Enzyme (z.B Triglyceridlipase, Phosphorylasekinase, Glykogensynthetase) und damit den Stoffwechsel der Zielzelle beeinflussen. Eine solche Wirkung konnte z.B. für ß-Sympathomimetika und verschiedene Polypeptidhormone nachgewiesen werden. Einfluß auf dieses System kann aber auch durch eine Hemmung der AC-Aktivität, z.B. mittels α_2-Sympathomimetika, genommen werden.

Mit der Isolierung von cGMP aus Rattenurin [1963 (9)] und dem Nachweis der für seine Synthese verantwortlichen GC [1969 (153,300,387)] wurde ein weiteres mögliches "second messenger"-System entdeckt. Zwischen der Regulation des cAMP- und der des cGMP-Spiegels bestehen jedoch deutliche Unterschiede. So kommt die GC in löslicher und partikulärer Form vor, und ihre Stimulation durch Hormone scheint nicht direkt, sondern unter Zwischenschaltung verschiedener Prozesse (verstärkter Calcium-Einstrom, Phospholipase-Aktivierung, Freisetzung ungesättigter Fettsäuren, Bildung von Fettsäureperoxiden, Hydroxylradikalen oder NO), zu erfolgen. Der schließlich zur Aktivierung führende Schritt besteht dann wahrscheinlich in einer Änderung des Oxidationszustandes der GC (226,229,301). Typische Stimulantien des cGMP-Spiegels sind z.B Cholinergika und α_1-Sympathomimetika. Als mögliche physiologische Funktionen von cGMP wurden u.a. eine Beteiligung an der hormonellen Regulation der intestinalen Sekretion und an der Relaxation der glatten Muskulatur vorgeschlagen (229).

Auch eine Mitwirkung an physiologischen Vorgängen im Magenkorpus, wie z.B. der Salzsäureproduktion, wurde sowohl für das cAMP [1965 (155)] als auch für das cGMP postuliert [1974 (4)]. Obwohl mit der Entwicklung eines RIA [1969 (345)] bzw Protein-Bindungs-Assays [1970 cAMP

(141), 1971 cGMP (230)] die methodischen Voraussetzungen für eine akkurate Bestimmung der cyclischen Nukleotide und der Überprüfung dieser Theorien gegeben waren, blieben die Ergebnisse, wohl auch auf Grund des heterocellulären Aufbaus der Magenschleimhaut, zuerst widersprüchlich [übersicht bei (175)]. Einen wichtigen Fortschritt brachten in dieser Situation Verfahren zur Isolation von Magenzellen [1969 (88)] bzw Magendrüsen [1976 (41)], wobei es zusätzliche Zellanreicherungsmethoden möglich machten, die Wirkungen von Substanzen einigermaßen selektiv in einzelnen Zelltypen aufzuzeigen. Das Interesse richtete sich dabei vor allem auf die als Ort der Magensäureproduktion erkannten PZ.

Inzwischen existieren zahlreiche Untersuchungen über die Beeinflußung des cAMP-Spiegels isolierter Magenzellen [übersichten bei (286,329, 369)], die eine Beteiligung dieser Substanz an verschiedenen physiologischen Vorgängen, wie z.B. der Magensäure- und Pepsinproduktion, wahrscheinlich machen (s. Teil H). über Regulation und Größe des cGMP-Spiegels isolierter Magenzellen wurden dagegen bis jetzt noch keine Daten veröffentlicht.

Ziel dieser Arbeit war es, die pharmakologische Beeinflussung des cGMP-Spiegels isolierter Magenzellen zu untersuchen und die Kenntnisse über die Regulation des cAMP-Spiegels zu vertiefen, bzw auf noch nicht untersuchte Substanzgruppen auszudehnen, um so das System der cyclischen Nukleotide in der Magenschleimhaut aus physiologischer und pharmakologischer Sicht besser charakterisieren zu können. Da bezüglich der Beeinflussung des cGMP-Spiegels der IZ bis jetzt noch keine Vergleichswerte existieren, wurde versucht in einer Art "screening" ein möglichst breites Spektrum an Substanzen auszutesten. Zur Auswahl kamen Stoffe, die einem oder mehreren der nachfolgend aufgeführten Kriterien genügten:

1. Stoffe mit Wirkung auf die Säure- oder Pepsinproduktion: Histamin, Antihistaminika, Cholinergika, Atropin, Pentagastrin, Prostaglandine und Präkursoren, Somatostatin, Proglumid, Insulin, Glucagon, Calcitonin, Dopamin, Pankreozymin, Serotonin, Calcium, Magnesium und Kalium
2. Stoffe mit schädigender oder "cytoprotectiver" Wirkung auf Magenschleimhautzellen: Nicht-steroidale Antirheumatika, Ethanol und Carbenoxolon

3. Typische Stimulantien bzw Inhibitoren des cAMP- oder cGMP-Spiegels in anderen Geweben: α- und ß-Sympathomimetika, indirekte Sympathomimetika, adrenerge Rezeptorenblocker, potentielle NO-Bildner, Thiole, Ascorbinsäure, Wasserstoffperoxid und Forskolin
4. Substanzen, für die permissive oder hemmende Interaktionen mit Aktivatoren des cAMP- oder cGMP-Spiegels bekannt sind: Trijodthyronin und Hydrocortison.

Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Entwicklung eines einfach durchführbaren, ausreichend sensitiven und spezifischen cAMP- und cGMP-Assays, der auch unter den Bedingungen der experimentellen Arbeit mit isolierten Zellen angewandt werden konnte.

B Ausarbeitung eines radioimmunologischen cAMP- und cGMP-Assays

Die Ausarbeitung richtete sich im wesentlichen nach der von Delaage et al (91) und Cailla et al (59) entwickelten Methodik. Besondere Kennzeichen dieses Verfahrens sind:
1. Eine Succinylierung der Proben mittels lyophilisiertem BA, wodurch eine Erhöhung der Affinität der cyclischen Nukleotide zu ihren Antikörpern und damit eine Verbesserung (324) der Assayempfindlichkeit erreicht wird.
2. Die Trennung des Antikörper-gebundenen Haptens vom freien Hapten durch Gleichgewichtsdialyse. Dabei wird in einer Cellulosemembranfilter-unterteilten Dialysekammer (Gesamtvolumen 200µl) die AS-Verd auf der einen Kammerseite mit dem radioaktiv markierten (Tracer) und dem nicht markierten Hapten (Probe, Standard) auf der anderen Kammerseite inkubiert. Da die Membran nur für die freien Haptene durchläßig ist, entspricht nach Gleichgewichtseinstellung die Aktivität auf der AS-Seite der Summe aus freier und gebundener , die Aktivität auf der anderen Seite der freien Aktivität allein.

Zusätzlich erwies es sich als notwendig eine Abtrennung störender Substanzen vorzunehmen. Geeignet hierfür war eine Reinigung der Proben mittels Al_2O_3 im "Batch"-Verfahren.

B.1 Antisera-Gewinnung

B.1.1 Präparation der Antigene

B.1.1.1 Koppelung von ScAMP bzw ScGMP an HSA

Die Koppelung an HSA erfolgte mit 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) unter Abwandlung der Methode von Steiner et al (345). Unter ständigem Rühren wurden 20mg HSA und 10mg ScAMP bzw ScGMP in 2ml Aqua bidest. gelöst und danach EDC in vier Portionen zu je 2,5mg in jeweils 15 minütigem Abstand zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde nach jeder Zugabe mit 1N-NaOH bzw HCl auf 5,5 eingestellt. Nach weiteren 2h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in einen Dialyseschlauch (Servapor) eingefüllt und unter Rühren 48h bei 4°C gegen 3l Phosphat-Puffer (K_2HPO_4/NaH_2PO_4 10mmol/l NaCl 150mmol/l pH 7,4) dialysiert, wobei der Dialysepuffer zweimal erneuert wurde. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde ge-

poolt und sein Volumen gemessen. Unter der Annahme einer 100%-igen Recovery der eingesetzten Nukleotide wurden dann Volumina entsprechend 1,25mg ScAMP bzw ScGMP bei -20°C eingefroren.

B.1.1.2 Überprüfung der Reaktionsprodukte

Das ScAMP- bzw ScGMP-HSA-Konjugat wurde durch Aufzeichnung seines UV-Spektrums identifiziert (345), wobei das Absorptionsmaximum bei 258nm die Anwesenheit der gebundenen Nukleotide und der Anstieg im Bereich (240nm das Vorhandensein von HSA aufzeigte (Abb 1 und 2). Für die quantitative Zusammensetzung der Konjugate ergaben sich durch Vergleich mit den Spektren von nicht konjugiertem HSA, ScAMP und ScGMP die in Tb 1 angegebenen Werte.

Nukleotid	Versuch		Mittelwert
	1	2	
ScAMP	5,1	4,5	4,8
ScGMP	8,9	15,3	12,1

Tb 1 Anzahl der pro HSA-Molekül gebundenen Nukleotid-Moleküle

B.1.2 Immunisierung

Für 5 Kaninchen (Rote Neuseeländer) wurde eine Antigenmenge entsprechend 1,25mg ScAMP bzw ScGMP in 5ml physiologischer Kochsalz-Lsg gelöst und mittels einer 10ml Spritze mit 5ml Freunds komplettem Adjuvans solange durchmischt, bis sich eine stabile Emulsion gebildet hatte. Dies zeigte sich daran, daß sich ein Tropfen des Gemisches bei Aufbringen auf Wasser nicht mehr verteilte. Jedem Kaninchen wurden 2ml dieser Emulsion in 50-70 Injektionen auf dem kahlgeschorenen Rücken intracutan appliziert. Nach der Grundimmunisierung erfolgten in 4 bis 6wöchigem Abstand in gleicher Weise die Booster-Injektionen.

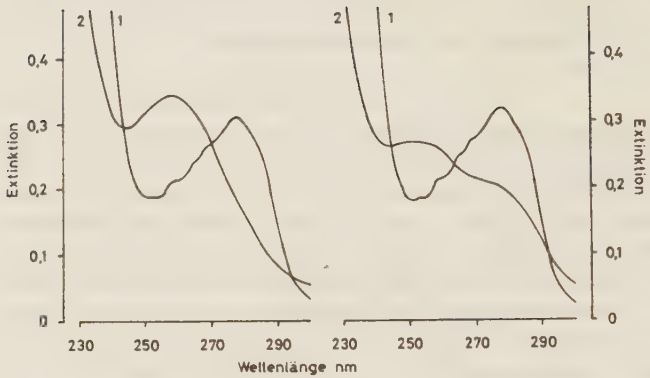


Abb 1 UV-Spektren von HSA, ScAMP-HSA und ScGMP-HSA
Messgerät: Beckman Spectrophotometer ACTA MVI; scan speed: 0,5nm/s; Dämpfung: 4; Mess-Medium: physiologische Kochsalz-Lsg pH7,4
links: ScAMP-HSA: Stamm-Lsg 1:75 verd. = Kurve 2; HSA: 570µg/ml = Kurve 1
rechts: ScGMP-HSA: Stamm-Lsg 1:50 verd. = Kurve 2; HSA: 630µg/ml = Kurve 1

B.1.3 Blutabnahme und Weiterverarbeitung

Die Blutabnahme erfolgte üblicherweise 10 Tage nach der Immunisierung (Abb 4) unter Abwandlung der in (129) beschriebenen Methode. Die Kaninchen wurden auf einem beheizten Tisch mit erhöhtem Fußteil in Rückenlage fixiert, die kahlgeschorenen Ohren mit einem Föhn erwärmt, durch einen Schnitt in die äußere Ohr-Randvene kontinuierlich Blut abgenommen und in 50ml Zentrifugengläsern gesammelt. Das Blut verblieb 1 bis 2h bei Raumtemperatur, dann wurden die Blutkuchen mit einem Glasstab von den Wandungen abgelöst und die Gläser über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 2100g in einer Christ-Zentrifuge wurden die Sera abgenommen und in 200 - 500µl Portionen bei -80°C eingefroren. Pro Kaninchen wurden durchschnittlich 11,3ml Serum erhalten.

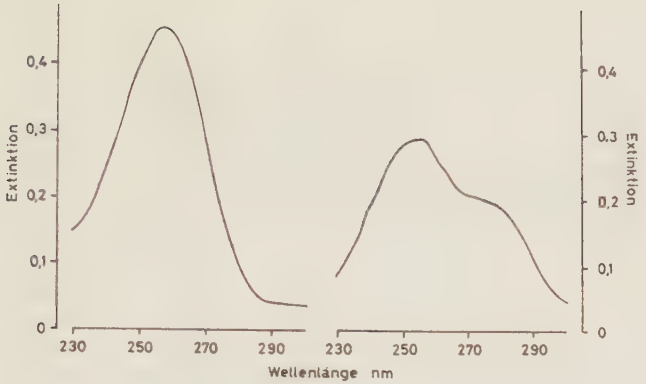


Abb 2 UV-Spektren von ScAMP und ScGMP
Messgerät, scan speed, Dämpfung und Mess-Medium: s. Leg Abb 1
links: ScAMP: 30µmol/l
rechts: ScGMP: 20µmol/l

B.1.4 Prüfung der Antisera

B.1.4.1 Bindung der radioaktiv markierten Haptene

B.1.4.1.1 Im Verlauf der Immunisierung erzielte Antikörper-Titer

Die Bindung der rmH durch die AS nach den verschiedenen Immunisierungen, die als Maß für die erzielten Antikörper-Titer diente, ist in Abb 3 dargestellt. Sie erreichte für die cAMP-AS ein Maximum nach der zweiten und für die cGMP-AS ein Maximum nach der vierten Booster-Injektion. Eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Bindungsfähigkeit ergab sich bei den cAMP-AS zwischen Grundimmunisierung und erster Booster- sowie zwischen erster und zweiter Booster-Injektion und bei den cGMP-AS zwischen zweiter und dritter Booster-Injektion (Abb 4).

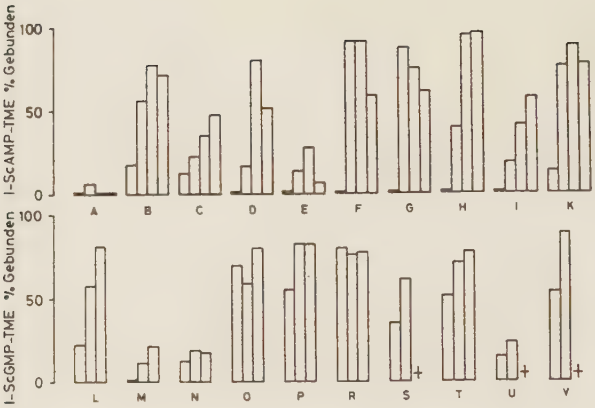


Abb 3 - oben: Bindung des J-ScAMP-TME durch die cAMP-AS nach Grundimmunisierung und Booster-Injektionen
AS-Verd: 10^4; RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1; die Blöcke bedeuten (von links nach rechs): Grundimmunisierung, 1., 2. und 3. Booster-Injektion

unten: Bindung des J-ScGMP-TME durch die cGMP-AS nach verschiedenen Booster-Injektionen
AS-Verd: 10^4; RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1; die Blöcke bedeuten (von links nach rechts): 2., 3. und 4. Booster-Injektion; +: Kaninchen gestorben

B.1.4.1.2 Einfluß der Serumverdünnung

Abb 5 zeigt die Bindung der rmH durch die im routinemäßigen RIA verwendeten AS H3 (cAMP) und T3 (cGMP) in Abhängigkeit von der Serumverdünnung. Eine Bindung von 50% wurde mit dem AS T3 bei einer Verdünnung von $2{,}5 \times 10^4$ und mit dem AS H3 bei einer Verdünnung von $1{,}3 \times 10^5$ (Citrat-Puffer) bzw von 1×10^5 (Acetat-Puffer) erzielt.

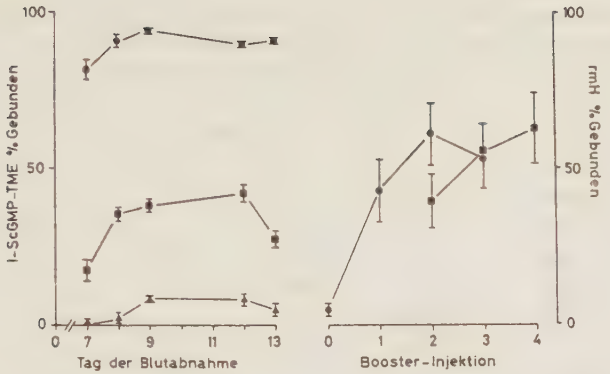


Abb 4 - links: Bindungsfähigkeit des cGMP-AS S2 für J-ScGMP-TME an verschiedenen Tagen nach der zweiten Booster-Injektion
AS-Verd: • = 10^3, ■ = 10^4, ▲ = 10^5; RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1

rechts: Durchschnittswerte für die Bindung der rmH durch die cAMP- und cGMP-AS
• = cAMP-AS, ■ = cGMP-AS; AS-Verd: 10^4; 0 = Grundimmunisierung
S-P: t-Test für Paare: % Gebunden: - cAMP-AS: 0 ↔ 1 $p<0,01$; 1 ↔ 2 $p<0,05$; 2 ↔ 3 n.s; - cGMP-AS: 2 ↔ 3 $p<0,05$; 3 ↔ 4 n.s

B.1.4.2 Spezifität der Antisera

B.1.4.2.1 Spezifität gegen andere Nukleotide und Nukleoside

Die Abb 6 und 7 zeigen die Verdrängung der rmH aus ihrer Bindung an die AS H3 und T3 durch cAMP, cGMP und chemisch verwandte Nukleotide und Nukleoside, die in den Versuchen der Abb 6 (oben) und 7 (oben) vor der Durchführung des RIA zusätzlich succinyliert worden waren. Dies bewirkte beim cAMP eine Verstärkung der Bindung um den Faktor 1160 und beim cGMP um den Faktor 39. In den Tb 2 und 3 sind die relativen Affinitäten verschiedener cAMP- und cGMP-AS für die geprüften Substanzen angegeben.

Substanz succinyl.	Relative Bindung in %			
	cAMP-AS H3	cGMP-AS T3	cGMP-AS P3	cGMP-AS V3
cAMP	100	0,01	0,002	0,001
cGMP	0,03	100	100	100
AMP	0,0003			
ADP	0,0005	0,0002		0,0004
ATP	<0,0001		<0,0003	
GMP	<0,0001		<0,0003	0,001
GTP	0,003		0,0006	0,003
Adenosin	0,0005	0,0005		
Guanosin		0,0001	<0,0003	<0,0004

Tb 2 Bindung von succinylierten Nukleotiden und Nukleosiden durch cAMP- und cGMP-AS

Berechnung (346) der relativen Bindung (RB):

RB% = Konz (cAMP bzw cGMP) / Konz Testsubstanz × 100%

Konz: Substanz-Konzentration, die im RIA 50% der gebundenen Aktivität verdrängte: AS-Verd: H3 = 3×10^4; T3,P3 und V3 = 10^4

Substanz nicht succinyliert	Relative Bindung in %	
	cAMP-AS H3	cGMP-AS T3
cAMP	100	0,004
cGMP	<0,1	100
AMP		<0,002
ATP		<0,002
GMP	<0,1	<0,002
GTP	1,8	<0,002
Adenosin	<0,1	
Guanosin	<0,1	

Tb 3 Bindung von nicht succinylierten Nukleotiden und Nukleosiden durch cAMP- und cGMP-AS

AS-Verd: H3 = 3×10^4; T3 = 10^4; Relative Bindung: s. Leg Tb 2

Die mit Hilfe eines Scatchard-Plots (56,57) ermittelten Dissoziationskonstanten für die Bindung von succinyliertem cAMP bzw cGMP durch die AS H3 und T3 betrugen $6,00 \times 10^{-11}$ bzw $6,19 \times 10^{-11}$ mol/l mit einer Konzentration an Antikörperbindungsstellen von 5,4µmol/l bzw 830nmol/l in den unverdünnten Sera (Abb 5).

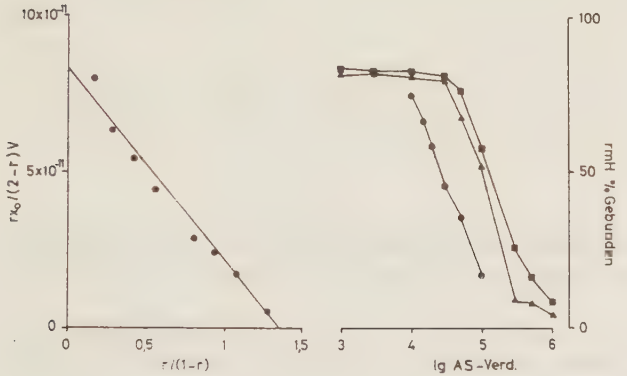


Abb 5 - links: Scatchard-Plot für die Bindung von succinyliertem cGMP durch das cGMP-AS T3
Für die Hapten-Antikörperreaktion gilt (56):
$rx_0/(2-r)V = a/V - Dr/(1-r)$ mit x_0: Menge des nicht markierten Haptens; a: Menge der Antikörperbindungsstellen; r: Verhältnis gebundene/(gebundene + freie) Aktivität; V: Flüssigkeitsvolumen; D: Dissoziationskonstante. Bei Auftragung von $rx_0/(2-r)V$ gegen r/(1-r) lassen sich D und die Konzentration der Antikörperbindungsstellen a/V durch lineare Regression bestimmen. Grundlage für die Berechnung waren die in Abb 16 dargestellten Standardkurven. Für beide Regressionsgeraden (cAMP ohne Abb) war $k = 0,99$ und $p < 0,01$

rechts: Bindung der rmH bei verschiedenen Serumverdünnungen
RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1; ●: cGMP-AS T3 mit CP verd.; ■: cAMP-AS H3 mit CP verd.; ▲: cAMP-AS H3 mit Acetat-Puffer 50mmol/l pH6,2 verd.

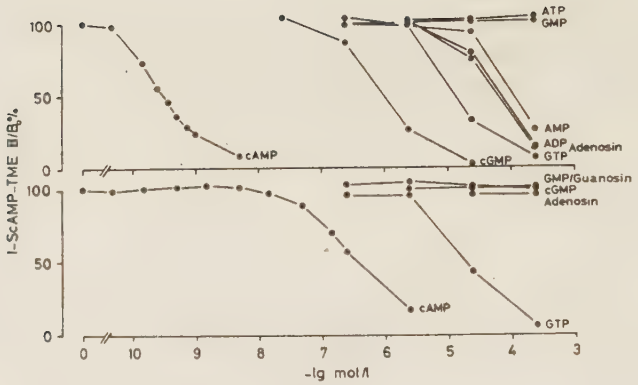


Abb 6 - oben: Verdrängung von J-ScAMP-TME aus seiner Bindung an das cAMP-AS H3 durch verschiedene succinylierte Nukleotide und Nukleoside
AS-Verd: 3×10^4; Probenbehandlung: Proben, in Acetat-Puffer 50mmol/l pH6,2 gelöst, wurden nach Vorschrift Kap B.9.2 succinyliert und mit CP verd. (Gesamtverd. 1:10); RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1

unten: Verdrängung von J-ScAMP-TME aus seiner Bindung an das cAMP-AS H3 durch verschiedene nicht succinylierte Nukleotide und Nukleoside
AS-Verd: 3×10^4; Probenbehandlung: Proben, in Acetat-Puffer 50mmol/l pH6,2 gelöst, wurden 1:10 mit CP verd.; RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1

B.1.4.2.2 Prüfung der Spezifität der Antisera durch Messung von cAMP- und cGMP- Gewebespiegeln

Für jedes AS wurde eine Standardkurve ermittelt und die Konzentration der cyclischen Nukleotide im gleichen Homogenat aus der Magenschleimhaut von Ratten bestimmt. Die mit den cAMP-AS gemessenen Werte lagen im Bereich von 695-1338fmol cAMP/mg Feuchtgewicht (Durchschnitt = 906), wobei zwischen den mit den AS B3, D3, F3, G3, H3 und K3 bestimmten cAMP-Spiegeln kein signifikanter Unterschied bestand. Der Mittelwert der cGMP-Bestimmungen betrug 149, Bereich 21-249fmol cGMP/mg Feuchtgewicht. Die Messung mit dem AS T3 lieferte dabei den signifikant niedrigsten Wert (Abb 8).

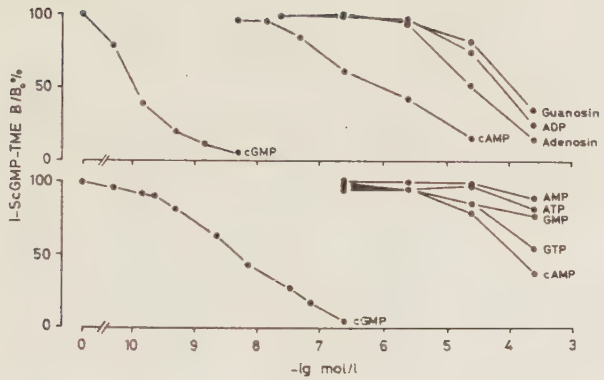


Abb 7 - oben: Verdrängung von J-ScGMP-TME aus seiner Bindung an das cGMP-AS T3 durch verschiedene succinylierte Nukleotide und Nukleoside
AS-Verd: 10^4; Probenbehandlung: s. Leg Abb 6 (oben)

unten: Verdrängung von J-ScGMP-TME aus seiner Bindung an das cGMP-AS T3 durch verschiedene nicht succinylierte Nukleotide
AS-Verd: 10^4; Probenbehandlung: s. Leg Abb 6 (unten)

B 1.4.2.3 Spezifität gegen Succinat

Das bei der Succinylierung durch Hydrolyse aus BA gebildete Kaliumsuccinat hatte in Konzentrationen bis 410mmol/l, was der Konzentration einer unverdünnten succinylierten Probe entsprach, keinen signifikanten Einfluß auf die Bindung der rmH durch die AS H3 und T3 (Tb 4).

Succinat-Konzentration mmol/l	cGMP-RIA	cAMP-RIA
	J-ScGMP-TME % Gebunden	J-ScAMP-TME % Gebunden
0	73,0 ± 1,0 n=3 100.0%	78.8 ± 0,2 n=3 100,0%
10,25	74,8 ± 0,7 n=3 102,4%	79,1 ± 0,4 n=3 100,4%
20,5	73,7 ± 0,5 n=3 100,9%	80,1 ± 0,5 n=3 101,7%
41	73,3 ± 0,6 n=3 100,4%	80,1 ± 0,3 n=3 101,7%
102,5	72,8 ± 0,2 n=3 99,7%	78,8 ± 0,5 n=3 100,0%
205	70,7 ± 0,7 n=3 96,9%	79,2 ± 0,4 n=3 100,6%
410	67,1 ± 2,5 n=3 91,8%	78,3 ± 1,5 n=3 99,4%

Tb 4 Einfluß von Kaliumsuccinat auf die Bindung der rmH durch die AS H3 und T3

Probenbehandlung: BA wurde wie in Kap B.9.2 beschrieben mit KOH behandelt und mit CP auf die angegebenen Konzentrationen verd.; RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1

S-P: G-t: % Gebunden: cAMP und cGMP: Succinat 0 ↔ Succinat andere Konzentrationen → n.s für alle Konzentrationen

B.1.4.3 Empfindlichkeit der Antisera

Die computerberechnete untere Nachweisgrenze in Standardkurven die mit succiniliertem cAMP bzw cGMP erhalten wurden, betrug bei einer Verdünnung von $1:10^4$ für die cAMP-AS nach der 3. Booster-Injektion

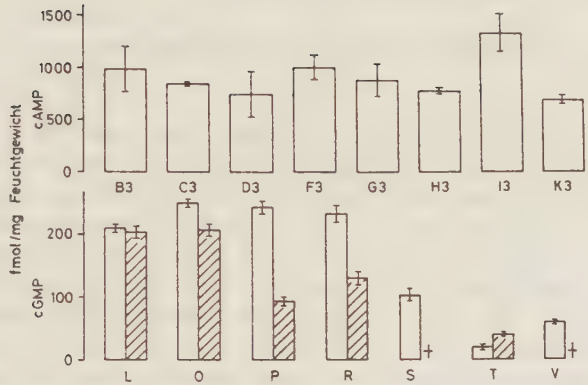


Abb 8 - oben: Messung des cAMP-Spiegels im Homogenat der Magenschleimhaut von Ratten mit verschiedenen AS
AS-Verd: 10^4; Probenbehandlung: Ratten wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet, die Mägen entnommen und die abgekratzte Magenschleimhaut sofort in SP mit $HClO_4$ 1N homogenisiert. Die Proben wurden nach Kap B.9.2 succinyliert und für jedes zu prüfende AS ein RIA nach Kap B.9.1 durchgeführt
S-P: G-t: cAMP: K3 ↔ andere AS → B3, D3, F3, G3 und H3 alle n.s; C3 und I3 $p<0,05$

unten: Messung des cGMP-Spiegels im Homogenat der Magenschleimhaut von Ratten mit verschiedenen AS
AS-Verd: 10^4; Probenbehandlung: s. oben; □: AS nach der 3. Booster-Injektion; ▨: AS nach der 4. Booster-Injektion; +: Kaninchen gestorben
S-P: - G-t: cGMP: T3 ↔ andere Sera, mindestens $p<0,01$; - t-Test für Paare: cGMP: (L3, O3, P3, R3, T3) ↔ (L4, O4, P4, R4, T4) n.s

durchschnittlich 12,4 (Bereich 3-30) fmol cAMP/Dialysekammer und für die cGMP-AS nach der 3. und 4. Booster-Injektion durchschnittlich 10,2 (Bereich 1-39) fmol cGMP/Dialysekammer. Durch Wahl einer geeigneten Serumverdünnung wurde im routinemäßigen RIA mit dem cGMP-AS T3 eine untere Nachweisgrenze von durchschnittlich 1,2fmol cGMP/Dialysekammer und mit dem cAMP-AS H3 von 2,9fmol cAMP/ Dialysekammer erzielt (1,2fmol/Dialysekammer = 6pmol/l) s. Kap. C4

B.2 Präparation der radioaktiv markierten Haptene

B.2.1 Jodierung von ScAMP-TME bzw ScGMP-TME - Reinigung der Reaktionsprodukte

Die Jodierung erfolgte nach Struck et al (349). 30µl einer wäßrigen Lsg von 1,8µg ScAMP-TME bzw ScGMP-TME wurden mit 50µl Phosphat-Puffer 500mmol/l pH7,4 und 10µl $Na^{125}J$ carrier free (üblicherweise 1mCi) versetzt. Vier Portionen von je 10µl einer frisch hergestellten Chloramin T-Lsg (10mg in 10ml Phosphat-Puffer 50mmol/l pH7,4) wurden in Abständen von 10s hinzupipettiert und weitere 10s später die Reaktion durch Zusatz von 100µl einer frisch hergestellten Natriumthiosulfat-Lsg (24mg in 10ml Phosphat-Puffer 50mmol/l pH7,4) gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 1ml eiskaltem Natriumacetat-Puffer 200mmol/l pH5,9 verdünnt und nach Aufbringen auf eine Sephadex G-25 superfine Säule (0,9×55cm) auch mit diesem Puffer bei 4^0C eluiert. Das mit Hilfe einer Pumpe eingestellte Elutionsvolumen betrug 9ml/h und Fraktionen von je 1,8ml wurden gesammelt. In jeder Fraktion wurde die Gesamtradioaktivität und der Anteil der spezifisch durch cAMP- bzw cGMP-AS zu bindenden Aktivität bestimmt (Abb 9 und 10). Die den mono-^{125}J-ScAMP-TME bzw mono-^{125}J-ScGMP-TME enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt, mit Acetat-Puffer 200mmol/l pH5,9 auf eine Aktivität von ungefähr 20×10^6cpm/ml eingestellt und in 1ml Portionen bei -20^0C eingefroren. Das von Struck in Kombination mit Acetat-Puffer zur Verdünnung vorgeschlagene n-Propanol wurde nur bei vier von insgesamt acht Jodierungen verwendet.

Die Jodierung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor J. Schultz, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, durchgeführt.

B.2.2 Verdünnung für den RIA

Der Anteil der durch die AS H3 und T3 bei verschiedenen Tracerverdünnungen gebundenen Radioaktivität ist in der Abb 11 dargestellt. Üblicherweise wurden die Tracer-Stammlösungen für den RIA 50fach verdünnt. da sowohl der cAMP- als auch der cGMP-Assay bei dieser Verdünnung die größte Empfindlichkeit aufwiesen (Tb 5).

Verdünnung der radioaktiv markierten Haptene	cGMP-RIA	cAMP-RIA
	Effekt von 10 fmol ScGMP △ % Gebunden	Effekt von 10 fmol ScAMP △ % Gebunden
5 fach	11,4	18,7
10 fach	16,0	18,8
15 fach	17,0	23,7
25 fach	15,7	26,0
50 fach	20,6	31,1
100 fach	12,9	13,2

Tb 5 Einfluß der Verdünnung der rmH auf die Empfindlichkeit der RIAs
RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1; AS-Verd: cAMP-AS H3 = $5x10^4$; cGMP-AS T3 = 10^4; rmH: Jodierung Januar 82

B.3 Extraktion der cyclischen Nukleotide

Die Extraktion der cyclischen Nukleotide und Deproteinisierung der Proben erfolgte mit $HClO_4$ (Endkonzentration 1N) unter Abwandlung der Methode von Cailla et al (58). Der nach Abzentrifugation des Protein-Präzipitats erhaltene saure Überstand wurde durch Zugabe von K_2CO_3 3,3 mol/l neutralisiert, die Perchlorat-Anionen als Kaliumperchlorat ausgefällt und durch Zentrifugation entfernt (s. Kap B.9.1).

B.3.1 Recovery von cAMP

Wie sich durch Messung der Recovery von ^3H-cAMP und durch Vergleich von Standardkurven mit und ohne Perchlorsäure-Vorbehandlung zeigen ließ, wurde cAMP an das Protein- bzw Kaliumperchlorat-Präzipitat nicht adsorbiert.

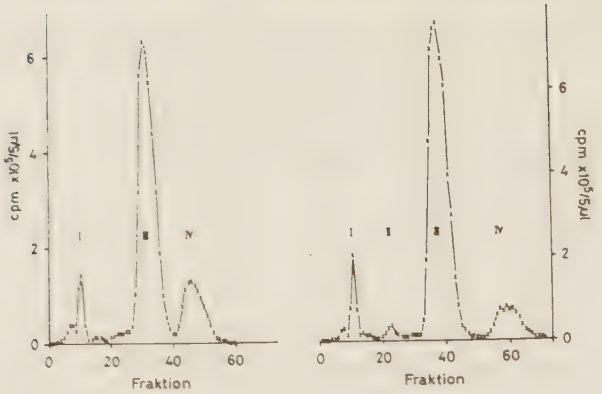


Abb 9 Bestimmung der Radioaktivität nach Auftrennung über Sephadex G-25 Säulen

Die ersten 10-15 Fraktionen des Säuleneluats wurden verworfen und die Radioaktivität von je 5µl der restlichen Fraktionen bestimmt. Identifizierung der Peaks nach (57): I = Jodid, II = J-ScTME, III = mono-J-ScAMP-TME bzw mono-J-ScGMP-TME, IV = di-J-ScAMP-TME bzw di-J-ScGMP-TME

links: J-ScAMP-TME: Die Fraktionen 28-38 wurden gepoolt. Sie enthielten 68% der von der Säule eluierten Gesamtradioaktivität

rechts: J-ScGMP-TME: Die Fraktionen 33-44 wurden gesammelt. Sie enthielten 76% der von der Säule eluierten Gesamtradioaktivität

B.3.2 Einfluß der Extraktionsdauer

Die Extraktion der cyclischen Nukleotide erfolgte nach $HClO_4$-Zugabe unter Schütteln. Zwischen den nach Schüttelzeiten von 1,5 bis 15min gemessenen cellulären cAMP- bzw cGMP-Spiegeln fand sich kein signifikanter Unterschied. Aus praktischen Gründen wurde in den späteren Versuchen eine Schütteldauer von 5min eingehalten.

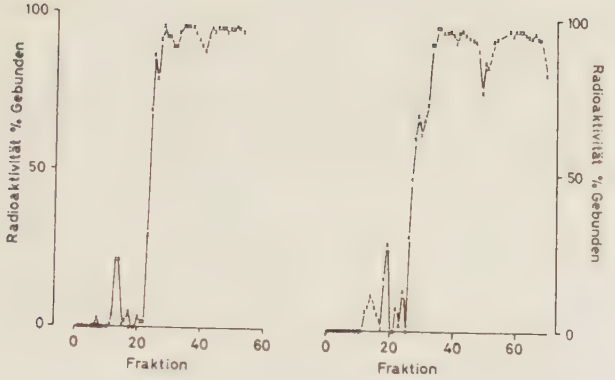


Abb 10 Bestimmung der in den einzelnen Fraktionen durch cAMP- bzw cGMP-AS spezifisch zu bindenden Aktivität
RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1, jedoch wurde in eine Hälfte der Dialysekammern jeweils 5µl Säuleneluat und 95µl CP mit 1mg/ml HSA, in die andere 100µl AS-Verd einpipettiert
links: J-ScAMP-TME: cAMP-AS H3 Verd: $1,5 \times 10^3$; der Anteil der gebundenen Aktivität in den gepoolten Fraktionen 28-38 betrug durchschnittlich 93,7%
rechts: J-ScGMP-TME: cGMP-AS T3 Verd: 2×10^2; der Anteil der gebundenen Aktivität in den gepoolten Fraktionen 33-44 betrug durchschnittlich 94,5%

B.4 Abtrennung störender Substanzen

B.4.1 Abtrennung durch Co-Präzipitation mit Bariumsulfat

Die Abtrennung störender Substanzen aus dem neutralisierten $HClO_4$-Auszug erfolgte nach Chan et al (67) mittels einer Bariumchlorid- und Natriumsulfat-Lösung (Tb 6). Eine auf diese Weise ermittelte Standardkurve für succinyliertes cGMP wies im Vergleich zu einer nach Delaage (s. Kap B.9.2) bestimmten Kurve einen signifikant erniedrigten Null- und 10fmol-Wert auf. Für die anderen Standardwerte bestand jedoch bezüglich der Bindung des J ScGMP-TME kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren. Dagegen lagen die im Homogenat aus Magenschleimhaut von Ratten bestimmten cGMP-Spiegel signifi-

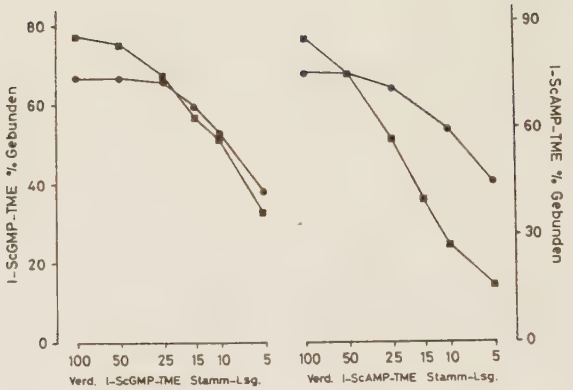


Abb 11 Bindung der rmH durch die AS bei verschiedenen Tracerverdünnungen
RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1
links: cGMP-RIA: cGMP-AS T3 Verd: 10^4; ● = Jodierung Januar 82; ■ = Jodierung August 82
rechts: cAMP-RIA: cAMP-AS H3 Verd: 5×10^4; ● = Jodierung Januar 82; ■ = Jodierung August 82

kant niedriger als die nach der Methode von Delaage et al (91) bestimmten Werte (Tb 6).

B.4.2 Abtrennung durch Behandlung mit Aluminiumoxid im Batch-Verfahren

Die Durchführung erfolgte wie in Kap B.9.1 beschrieben. Standardkurven für succinyliertes cGMP, nach diesem Verfahren oder nach der Methode von Delaage (s. Kap B.9.2) ermittelt, unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dagegen lagen die mit der Al_2O_3-Methode ermittelten cGMP-Homogenatspiegel signifikant niedriger als die nach Delaage bestimmten Werte, unterschieden sich aber nicht nachweisbar von den mit dem Bariumsulfat-Verfahren erhaltenen (Tb 6).

Verfahren	Gemessener cGMP-Spiegel fmol/mg Feuchtgewicht	
	cGMP-AS T3	cGMP-AS P3
Delaage	36,4 ± 2,5 n=4 100%	198,9 ± 14,8 n=4 100%
Aluminiumoxid	13,9 ± 1,1 n=4 38%	96,0 ± 5,0 n=4 48%
Bariumsulfat	14,1 ± 0,6 n=4 39%	106,3 ± 2,5 n=4 54%

Tb 6 Nach der Methode von Delaage bzw nach dem Bariumsulfat- oder Al_2O_3-Verfahren bestimmte cGMP-Spiegel im Homogenat aus Magenschleimhaut von Ratten

Angewandte Verfahren: Delaage, s. Kap B.9.2; Al_2O_3, s. Kap B.9.1; Bariumsulfat, 150µl Überstand der $KClO_4$-Fällung + 20µl Bariumchlorid 1,02mol/l + 20µl Natriumsulfat 1,14mol/l → Niederschlag abzentrifugieren → 150µl Überstand + 20µl KOH 5,67mol/l → 150µl dieser Lösung + 6,15mg BA → danach wie in Kap B.9.1; Homogenat-Gewinnung: s. Leg zu Abb 8; AS-Verd: T3 und P3 = 10^4

S-ᵃ: G-t: AS P3 und T3: cGMP: Del ↔ Alu $p<0,001$; Del ↔ Bar $p<0,001$: Alu ↔ Bar n.s

B.4.2.1 Recovery der cyclischen Nukleotide

Die Recovery von ^3H-cAMP bzw ^3H-cGMP nach Al_2O_3-Behandlung betrug bei in SP gelösten Proben 95,8 ± 0,7 bzw 99,8 ± 0,8% und war nur für das ^3H-cAMP signifikant ($p<0,01$) von 100% verschieden.

B.4.2.2 Abtrennung störender Nukleotide

Als Maß für die Anwesenheit störender Nukleotide im RIA diente die bei Messung eines Nukleotidgemisches auftretende unspezifische Verdrängung von J-ScGMP-TME. Bei Anwendung des Al_2O_3- bzw Bariumsulfat-Verfahrens betrug der dadurch vorgetäuschte "scheinbare" cGMP-Wert weniger als 3% des bei der Delaage-Methode erhaltenen Wertes (→ Adsorption der interferierenden Nukleotide > 97%).

Verfahren	Für das Nukleotidgemisch gemessener "scheinbarer" cGMP-Wert fmol/200µl Proben-Lsg	
	cGMP-AS T3	cGMP-AS P3
Delaage	3622 ± 273 n=2 100,0%	2402 ± 272 n=2 100.0%
Aluminiumoxid	84 ± 2** n=2 2,3%	203 ± 2* n=2 8,4%
Bariumsulfat	99 ± 15** n=2 2,7%	45 ± 11* n=2 1,9%

Tb 7 Einfluß der Proben-Vorbehandlung auf den "scheinbaren" cGMP-Wert bei Bestimmung eines Nukleotidgemisches
Angewandte Verfahren: s. Leg Tb 6; AS-Verd: T3 und P3 = 10^4; Nukleotid-Gemisch: ATP,ADP,AMP,GTP und GMP je 33µmol/l
S-P: G-t: cGMP: Del ↔ andere Verfahren → s. Tb

B.4.2.3 Einfluß der Aluminiumoxid-Menge

Der Einfluß der Al_2O_3-Menge auf die in IZ gemessenen Spiegel der cyclischen Nukleotide ist in Abb 12 dargestellt. Der cGMP-Messwert wurde schon durch 3,5mg signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt, veränderte sich aber im Bereich von 14 - 56mg nicht mehr nachweisbar. Dagegen nahm der cAMP-Wert kontinuierlich ab und eine signifikante Erniedrigung ergab sich erst mit Al_2O_3-Mengen von 42mg oder mehr. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in den übrigen Versuchen rou-

tinemäßig eine Menge von 28mg Al_2O_3/Probe verwendet.

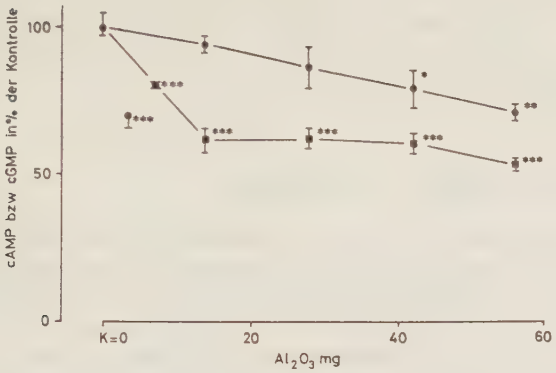


Abb 12 Einfluß der Al_2O_3-Menge auf die in IZ gemessenen cAMP- und cGMP-Spiegel
Probenbehandlung: wie in Kap B.9.1, jedoch unter Verwendung der in der Abb angegebenen Al_2O_3-Mengen; zur Berechnung wurden Standardkurven für succinyliertes cAMP bzw cGMP mit 28mg Al_2O_3-Vorbehandlung verwendet; die Al_2O_3-Zugabe erfolgte im Batch-Verfahren mittels Messlöffel. 1 Messlöffel entsprach 28,1 ± 0,2mg Al_2O_3 (n=10); ● = cAMP-Messwerte; ■ = cGMP-Messwerte
S-P: G-t: - cAMP und cGMP: Al_2O_3 0mg ↔ andere Al_2O_3-Mengen → s. Abb; - cGMP: Al_2O_3 14mg ↔ Al_2O_3 56mg n.s

B.4.2.4 Zusätzliche Lyophilisation der Proben

Durch Lyophilisation des neutralen Überstandes der Al_2O_3-behandelten Proben konnte die Konzentration der cyclischen Nukleotide annähernd verdoppelt und damit ein günstigeres Probenvolumen erreicht werden. Die Lyophilisation hatte keinen Einfluß auf die Standardkurven und Messwerte. In den routinemäßig durchgeführten Assays konnte auf eine zusätzliche Lyophilisation allerdings verzichtet werden, da die Empfindlichkeit der Bestimmungen auch ohne diesen Schritt ausreichend war.

B.5 Succinylierung

Die Succinylierung der mit KOH alkalisierten Proben erfolgte nach Delaage et al (91) durch lyophilisiertes BA in wäßrigem Medium (s. Kap B.9.1), wobei der pH-Wert der Lösungen nach Beendigung der Reaktion <7 war (aus dem Verhältnis der KOH- und BA-Mengen berechneter theoretischer pH-Wert = 6,2)

B.5.1 Lyophilisation von Bernsteinsäureanhydrid

Die Lyophilisation wurde wie in Kap B.9.1.1 beschrieben durchgeführt. Gemäß Vorschrift (s. Kap B.9.1.2) wird zu dem lyophilisierten BA KOH zugegeben. Der Einfluß der Lyophilisationsdauer auf den pH-Wert dieser Lösung ist in Abb 13 dargestellt. Nach Lyophilisationszeiten von 11 und mehr Stunden stieg der pH-Wert signifikant über den Ausgangswert von 6,2 an, während nach einstündiger Lyophilisation das Dioxan noch nicht vollständig entfernt war. Routinemäßig wurde deshalb eine Lyophilisationsdauer von 3h eingehalten.

B.5.2 Ausbeute der Succinylierung

Zur Überprüfung des quantitativen Verlaufs der Succinylierung wurden Standardkurven für käuflich erworbenes ScAMP und für succinyliertes cAMP miteinander verglichen. Wie in Tb 8 dargestellt ist, waren diese bezüglich der Bindung des rmH nicht signifikant voneinander verschieden.

B.5.2.1 Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes der Proben auf die Succinylierung ist in Abb 13 dargestellt, wobei die Verdrängung von J-ScAMP-TME im RIA als Maß für die Ausbeute der Reaktion diente (s. auch Kap B.1.4.2.1). Erst ab pH-Werten >12,2 trat eine signifikante Erniedrigung der Bindung des J-ScAMP-TME im Vergleich zur Kontrolle (= pH7,4) auf. Mit dem im routinemäßigen Assay zugesetzten KOH wurde ein pH-Wert von 13 bis 14 vor der Succinylierung erreicht.

Nicht radioaktiv markiertes Hapten fmol/Dialysekammer	J-ScAMP-TME % Gebunden	
	käufliches ScAMP	succinyliertes cAMP
0	54,88 ± 1,09 n=3	54,42 ± 0,16 n=2
10	44,13 ± 0,70 n=3	40,50 ± 1,41 n=3
20	36,71 ± 1,23 n=3	40,49 ± 0,67 n=3
50	20,15 ± 0,43 n=2	22,99 ± 2,00 n=3
100	22,93 ± 2,76 n=2	17,86 ± 2,47 n=3
500	8,02 ± 0,36 n=2	7,19 ± 1,60 n=3
1000	6,80 ± 1,21 n=3	2,00 ± 0,13 n=2

Tb 8 Vergleich von Standardkurven für succinyliertes cAMP und für käuflich erworbenes ScAMP

Probenbehandlung: käufliches ScAMP - in CP verd.; succinyliertes cAMP - Succinylierung nach Kap B.9.2, dann in CP verd.; cAMP-AS H3 Verd: 3×10^4; RIA-Durchführung: s.Kap B.9.1

S-P: G-t: % Gebunden: jeweils ScAMP ↔ succinyliertes cAMP → n.s für alle Werte

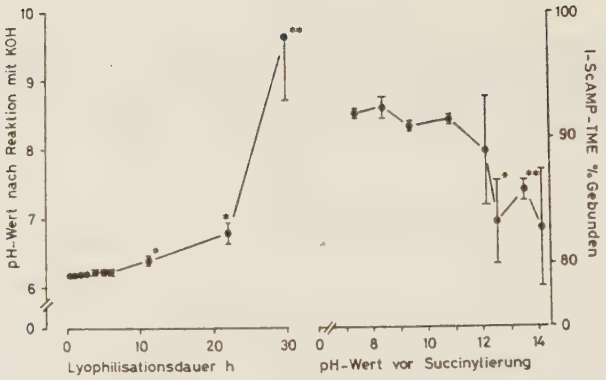


Abb 13 -links: Ermittlung einer geeigneten Lyophilisationsdauer
BA-Proben (7,38mg/150µl Dioxan) wurden die angegebenen Zeiten lyophilisiert, anschließend 180µl KOH 0,667mol/l zugegeben und der pH-Wert der Lösungen bestimmt. Der berechnete theoretische pH-Wert war 6,2; bei Lyophilisationszeiten bis 1h war noch flüssiges Dioxan vorhanden
S-P: G-t: pH-Wert: 1,5h ↔ andere Zeiten → s. Abb

rechts: Einfluß des pH-Wertes der Proben auf die Ausbeute der Succinylierung
cAMP-Standardwerte (1pmol/ml in SP) wurden durch KOH-Zugabe auf die in der Abb angegebenen pH-Werte eingestellt und danach zu BA-Mengen pipettiert die ausreichend waren den pH-Wert nach Beendigung der Reaktion auf 6,2 zu bringen. Nach Verdünnung der Proben mit CP auf 2fmol/200µl wurde ein RIA nach Kap B.9.1 durchgeführt.
S-P: G-t: % Gebunden: jeweils pH7,4 ↔ andere pH-Werte → s. Abb

B.6 RIA

Die Inkubation der Proben erfolgte nach Cailla et al (56) in Cellulosemembranfilter-unterteilten Dialysekammern. Der Anteil der freien und gebundenen Aktivität läßt sich dabei nach Gleichgewichtseinstellung ohne zusätzliche Trennungsmaßnahmen durch Messung der Radioaktivität von je 80µl Flüssigkeit beider Kammerhälften bestimmen (s. Einleitung zu Teil B, Kap B.7.1 und Kap B.9.1).

B.6.1 Kinetik der Hapten-Antikörper-Reaktion

Die Bindung der rmH durch die AS H3 und T3 erreichte bei Inkubation mit und ohne Schütteln bei 4°C nach 24h ein Plateau und blieb dann bis 48h konstant. Der Zusatz von nicht markiertem Hapten (ScAMP bzw ScGMP) änderte den Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung nicht. Ohne AS wurde ein Äquilibrium für die Verteilung der rmH auf die beiden Kammerhälften nach 4h erzielt (Abb 14). Aus praktischen Gründen wurde in den routinemäßigen Assays eine Inkubationsdauer von 18h eingehalten.

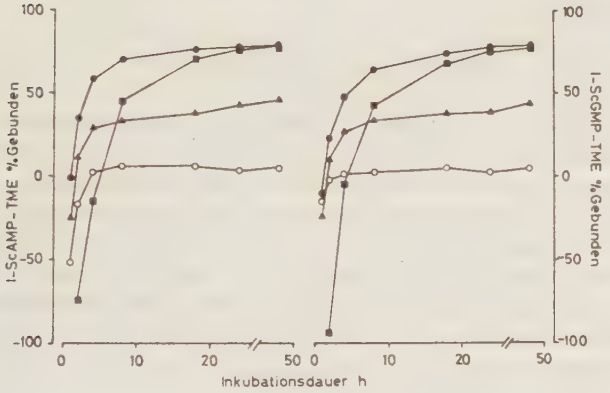


Abb 14 Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung der rmH durch die AS H3 und T3
RIA-Durchführung: s. Kap B.9.1; Inkubations-Temperatur: 4°C; ● = rmH - geschüttelt; ■ = rmH - nicht geschüttelt; ▲ = rmH + 30fmol ScAMP bzw ScGMP - geschüttelt; o = rmH ohne AS inkubiert - geschüttelt
links: cAMP-RIA: cAMP-AS H3 Verd = 5×10^4
rechts: cGMP-RIA: cGMP-AS T3 Verd = 10^4

B.6.2 Einfluß der Kammer- und Membranvorbehandlung

Die Vorbehandlung der Dialysemembranen (Auskochen bzw Nichtauskochen) hatte keinen Einfluß auf die im RIA erzielte Bindung. Trotzdem erwies es sich als zweckmäßig neue Membranen kurz (≈ 2min) in kochendes Aqua bidest. zu legen und sie dann in noch warmem Zustand in die Dialysekammern einzusetzen, da sich dadurch nach Erkalten eine straffere Membranoberfläche ergab. Die Reinigung der Kammern mit Aqua demineralisata oder mit Detergens vor Einsetzen der neuen Membranen und das Verdünnen der AS in Glas- oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen hatten ebenfalls keinen Einfluß auf die Bindung im RIA.

B.7 Versuchsauswertung

B.7.1 Berechnung der gebundenen Radioaktivität

Die Antikörperbindung der rmH wurde nach Cailla et al (56) durch Messung der Aktivität von je 80µl Flüssigkeit aus beiden Kammerhälften bestimmt (gesamtes Flüssigkeitsvolumen in einer Dialysekammer = 2×100µl). Auf der Immunserumseite entsprach die Radioaktivität der Summe aus freier und gebundener Aktivität (B+F), auf der anderen Seite der freien Aktivität allein (F). Aus der Differenz errechnete sich der gebundene Anteil zu $[(B+F)-F)]/(B+F) = B/(B+F)$ oder % Gebunden = $B/(B+F)\times100\%$. Als B_0-Wert wurde die Bindung in Abwesenheit von nicht markiertem Hapten bezeichnet.

B.7.2 Berechnung der Ergebnisse des RIA

Die RIA-Standardkurven wurden durch einen Rechner (HP 9825A) mittels einer Spline-Funktion (RIA-Programm der Firma Berthold) berechnet und über einen Plotter (HP 9871A) ausgedruckt. Die Konzentrationen der zu bestimmenden Proben wurden vom Rechner anhand der Standardkurven ermittelt. Für jeden Messwert wurden folgende Angaben ausgedruckt: Probennummer, Messzeit, gemessene Aktivität in cpm, gebundener Anteil der Aktivität (% Gebunden), Mittelwert von % Gebunden (aus der Messung von je 3 Replikaten pro Probe), Variationskoeffizient dieses Mittelwertes in %, B/B_0 in %, berechnete Proben-Konzentration und deren Vertrauensgrenzen (bei Standardwerten die eingesetzte Konzentration und das berechnete reziproke Gewicht) und schließlich Hin-

weise auf statistisch unsichere bzw nicht zur Berechnung verwendbare Daten. Die RIA-Standardkurven wurden ausgedruckt in einem Koordinatensystem mit dem Logarithmus der Konzentration der Standardwerte auf der Abszisse und der gebundenen Aktivität in $\%B/B_0$ auf der Ordinate. Zusätzlich wurde die untere Nachweisgrenze der Bestimmung in fmol und in $\%B/B_0$, die Konzentration des nicht markierten Antigens für eine Bindung von B/B_0 = 50% (Halbsattigung), die für die Berechnung der Standardkurve benötigte Anzahl an Näherungen, der sich daraus ergebende Glättungsfaktor und Kontrollquotient sowie die Anzahl der Extrema und Wendepunkte der Kurve angegeben.

B.7.3 Statistische Auswertung

Die Prüfung der Ergebnisse auf signifikante ($p<0,05$) Unterschiede zwischen den Messwerten erfolgte durch Student's zweiseitigen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten [Gruppen t-Test (G-t)] bzw bei paariger Anordnung der Daten durch den t-Test für Paare. Bei wiederholt durchgeführten Experimenten bzw bei Versuchen, in denen die Interaktionen zwischen mehreren Substanzen untersucht wurden, wurde die Auswertung durch Varianzanalyse (V) [Faktorielles Modell mit Interaktion, Berechnung mittels des General Linear Model von System Analysis Service (SAS)] vorgenommen. Auf Korrelation zwischen zwei Faktoren wurde durch lineare Regression geprüft. Die Darstellung der Ergebnisse in den Tb und Abb erfolgte, falls nicht anders erwähnt, durch Angabe der Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Die Ergebnisse der Signifikanz-Prüfungen (S-P) wurden nach folgendem Schema angegeben: 1. Angewandter statistischer Test (z.B. G-t) 2. Untersuchter Parameter (z.B. cAMP) 3. Verglichene Messwerte (z.B. Kontrolle ↔ Testsubstanz) 4. Ergebnis des statistischen Tests (z.B. n.s, $p<0,05$).

B.8 Behandlung der Standards

cAMP bzw cGMP (10mmol/l) wurden in Acetat-Puffer 5mmol/l pH 4.75 gelöst (cGMP löst sich erst nach alkalisieren mit Natriumhydroxid), im selben Puffer auf eine Konzentration von 1mmol/l verdünnt [überprüfung durch Extinktionsmessung s. (50)] und bei -20°C eingefroren. Die benötigten Standardwerte wurden dann durch Verdünnung in dem jeweiligen Assay-Puffer hergestellt.

B.9 Zusammenfassende Vorschriften für die Durchführung des cAMP- und cGMP-Assays

B.9.1 Aluminiumoxid-Methode

B.9.1.1 Vorbereitungen

Probenextraktion:	Herstellung von $HClO_4$ 11N und K_2CO_3-Lsg 3,3 mol/l
Succinylierung:	Herstellung von KOH-Lsg 2,5 mol/l - BA (49,2mg/ml) unter Rühren in Dioxan lösen, 150µl Portionen in Eppendorf-Gefäßen für 30min bei -20°C einfrieren, 3h lyophilisieren, danach bei Raumtemperatur aufbewahren, Deckel mit Aluminiumfolie abdichten
Verdünnung für RIA:	Herstellung von Citrat-Puffer 100mmol/l pH6,2 mit 50mg/l Natriumazid (CP)
RIA: Antiserum	Herstellung der benötigten Verdünnung in CP unter Zusatz von HSA 1mg/ml. In 20ml Portionen bei -80°C einfrieren
rmH	Unmittelbar vor Verwendung Stamm- Lsg auftauen und 1:50 in CP unter Zusatz von HSA 2mg/ml verdünnen
Dialysekammern	Unmittelbar vor Gebrauch mit 500ml Aqua demineralisata/Dialyseblock spülen (1 Block enthält 10 Dialysekammern), Wasserreste mit Kanüle (Wasserstrahlpumpe) absaugen
Auswertung:	Die zur Berechnung benötigten Größen (u.a. Anzahl und Größe der Standardwerte, Anzahl der pro Probe gemessenen Replikate) in das Computerprogramm eingeben

B.9.1.2 Durchführung

Extraktion

200µl Probe + 20µl $HClO_4$ 11N

|

5min schütteln

|

zentrifugieren

|

200µl Überstand + 40µl K_2CO_3 3,3 mol/l

|

schütteln

|

zentrifugieren

|

Überstand prüfen (pH≈7)

|

Reinigung

200µl Überstand + 28mg Al_2O_3

|

schütteln

|

zentrifugieren

|

Succinylierung

150µl Überstand + 50µl KOH 2,5 mol/l

|

schütteln

|

zentrifugieren

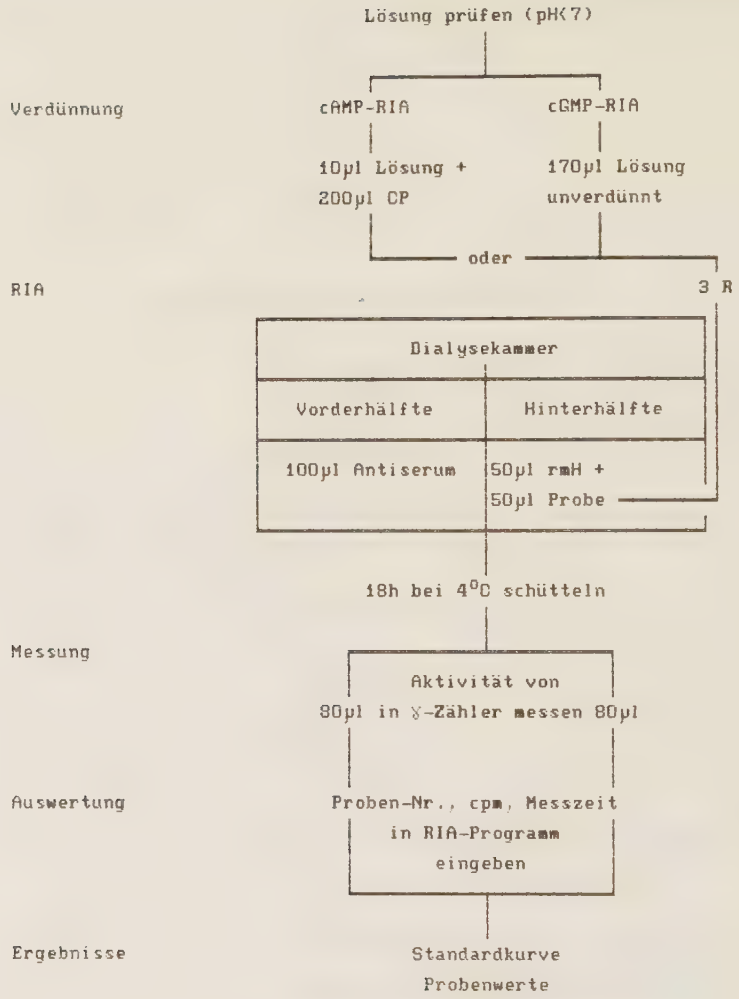
|

180µl Überstand + 7,38mg BA

|

schütteln

|



Erläuterungen: zentrifugieren = 2min bei 10 000g (Eppendorf-Zentrifuge); 3 R = Pro Probe wurden 3 Replikate von je 50µl gemessen. Die Proben-Extraktion, Reinigung, Succinylierung und Verdünnung wurde in Eppendorf-Gefäßen 1,5ml durchgeführt. Die Aktivität wurde in Minivials bestimmt, wobei pro Probe 10^4 counts gemessen wurden. Für serienmäßiges Pipettieren wurde eine Eppendorf-Multipette 4780 verwendet. Die Dateneingabe in das RIA-Programm erfolgte automatisch.

B.9.2 Methode nach Delaage et al (91)

Extraktion

200µl Probe + 20µl $HClO_4$ 11N

|

5 Minuten schütteln

|

zentrifugieren

|

200µl Überstand + 40µl KOH 9 mol/l

|

schütteln

|

zentrifugieren

|

Succinylierung

180µl Überstand + 7,38mg BA

Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie in Kap B.9.1.2 beschrieben.

C Überprüfung der Messwerte

C.1 Messung bei verschiedenen Zellkonzentrationen

Zwischen den cAMP- bzw cGMP-Werten und den für die Messung verwendeten Zellmengen bestand bis zu der größten geprüften Konzentration von $5x10^7$ Zellen/ml eine positive lineare Korrelation. Nähere Einzelheiten s. Abb 15

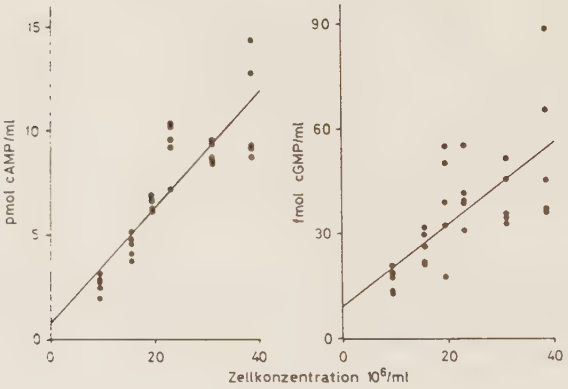


Abb 15 Korrelation zwischen Zellmenge und cAMP- bzw cGMP-Messwert
Probenbehandlung: Die Zellen wurden auf die benötigte Konzentration verdünnt, jeweils 200µl Zellsuspension 15s in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment in 200µl $HClO_4$ 1N aufgenommen. Weitere Behandlung s. Kap B.9.1; Prüfung auf Korrelation: Berechnung der Regressionsgeraden y = b + ax (y: Gesamtmesswert: b: Wert für Medium ohne Zellen; a: Messwert/10^6 Zellen; x: Zellkonzentration in 10^6/ml)
links: cAMP-Messwerte: Regressionsgerade
y = (0,84 ± 0,73)pmol + (0,27 ± 0,03)pmol/10^6 Zellen x X ; k = 0,87
rechts: cGMP-Messwerte: Regressionsgerade
y = (9,9 ± 5,8)fmol + (1,2 ± 0,2)fMol/10^6 Zellen x X; k = 0,69
S-P: cAMP und cGMP: b → n.s von Null verschieden; a → signifikant ($p<0,0001$) von Null verschieden; k → signifikant ($p<0,001$) von Null verschieden

C.2 Recovery von cGMP

Die Recovery im RIA für dem $HClO_4$-Auszug aus IZ zugesetztes cGMP betrug 98,7 ± 11% (E=2 n=14) und war damit nicht signifikant von 100% verschieden.

C.3 Phosphodiesterase-Versuche

Nach der Behandlung von Proben mit Phosphodiesterase ließen sich keine signifikanten cGMP-Mengen mehr nachweisen. Dagegen waren in 2 von 5 Versuchen noch signifikante cAMP-Mengen vorhanden, wobei der durchschnittlich hydrolysierte cAMP-Anteil in Homogenat-Proben 98,2 ± 0,6% und in IZ 90,2 ± 0,5% betrug.

C.4 RIA-Qualitätskontrolle

Abb 16 zeigt die in den cAMP- und cGMP-Assays für die Standardwerte erhaltene durchschnittliche Bindung. In den Abb 17 und 18 ist der zeitliche Verlauf verschiedener im cAMP- und cGMP-Assay gemessener Parameter in der Form einer Shewartschen Kontrollkarte (323) dargestellt. Die daraus berechneten Durchschnittswerte sind in Tb 9 dokumentiert. Die Interassay-Varianz betrug im cAMP-Assay 23% (für den 10fmol-Standard) und im cGMP-Assay 21% (für den 5fmol-Standard). Die Intraassay-Varianz für die Bestimmung der Zellspiegel belief sich im cAMP-Assay auf 13,8% und im cGMP-Assay auf 16,7%.

Parameter		cAMP-Assay	cGMP-Assay
B_0		80,58 ± 1,16 n=26	62,23 ± 0,95 n=19
Untere Nachweigrenze	$\%B_0$	98,32 ± 0,13 n=26	95,69 ± 0,22 n=19
	fmol	2,89 ± 0,03 n=26	1,23 ± 0,11 n=19
Halbsättigung	fmol	28,62 ± 1,21 n=26	31,70 ± 2,25 n=19

Tb 9 Parameter zur Charakterisierung des cAMP- und cGMP-Assays
n: Anzahl der Assays; fmol: fmol succingliertes cyclisches Nukleotid/Dialysekammer; B_0: Bindung in Abwesenheit von nicht markiertem Hapten (s. Kap B.7.1); Untere Nachweisgrenze: vom RIA-Programm automatisch berechnet; Halbsättigung: B/B_0 = 50%

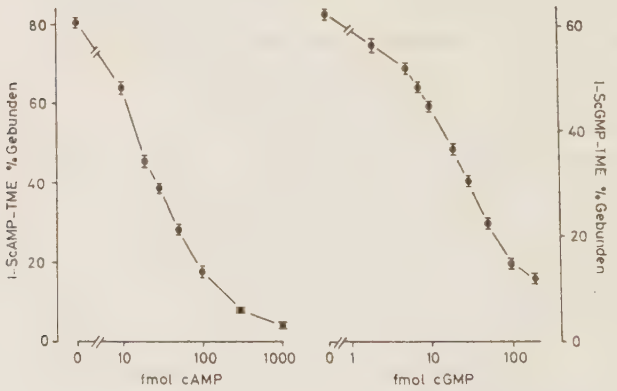


Abb 16 Durchschnittliche Bindung der cAMP- und cGMP-Standardwerte im RIA
fmol: fmol succingliertes cyclisches Nukleotid pro Dialysekammer
links: cAMP-RIA: Mittelwerte ± SEM aus 26 Versuchen
rechts: cGMP-RIA: Mittelwerte ± SEM aus 19 Versuchen

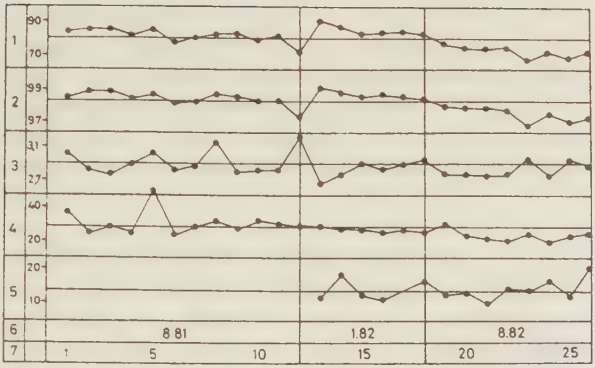


Abb 17 Shewartsche Qualitätskontrollkarte für den cAMP-Assay
Zeilenbreite: Mittelwert der Bestimmungen ± 3 SD; 1: B_0-Wert s. Kap B.7.1; 2: Untere Nachweisgrenze in % von B_0; 3: Untere Nachweisgrenze in fmol/Dialysekammer; 4: Halbsättigung (s. Tb 9) in fmol/Dialysekammer; 5: Messwert für exogenes succinyliertes cAMP (Theoriewert 10fmol); 6: Jodierungsdatum des verwendeten rmH; 7: RIA-Nummer

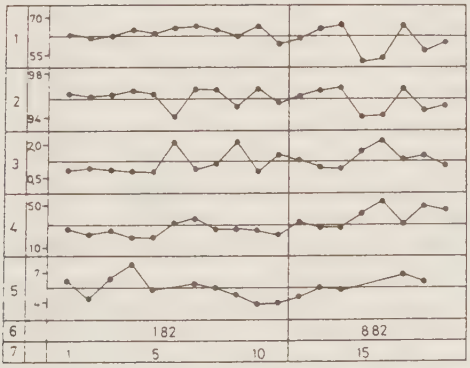


Abb 18 Shewartsche Qualitätskontrollkarte für den cGMP-Assay
Erläuterungen: s. Abb 17 außer Zeile 5: Messwert für exogenes succinyliertes cGMP (Theoriewert 5fmol)

C.5 Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Literaturwerten

Die gemessenen Homogenat-Spiegel der cyclischen Nukleotide und die Werte anderer Autoren sind zum Vergleich in Tb 10 und 11 dargestellt. Eine Zusammenfassung der in IZ aus der Magenschleimhaut der Ratte gemessenen Spiegel findet sich in Kap F.1. Während für das cGMP noch keine Vergleichswerte vorliegen, sind die bereits veröffentlichten Daten über den cAMP-Spiegel isolierter Rattenzellen in Tb 12 dokumentiert.

Autor	Messwert fmol cAMP/mg Feuchtgewicht	Messmethode	Literatur-stelle
Diese Arbeit	917	RIA	
Amer M.S	910	PBA	2
Domschke W.	1000	EM	95,96
Ekblad E.B.M	310+	RIA	111
Fedchenko S.N	1000-1500	?	117
Puurunen J.	1470+	PBA	250
	1870+	PBA	249
	860-1310	PBA	253
Ruoff H-J	600-700	PBA	274,275
	520	PBA	279
	200-300	PBA	271,276
Schwartzl E.H	600	RIA	302
Tague L.L	2000	PBA	355
Takakura J.	410+	RIA	356
Zarrindast M.	967	RIA	392

Tb 10 cAMP-Homogenatspiegel im Magenkorpus der Ratte

+: Werte wurden im Original in fmol cAMP/mg Protein angegeben. Die Umrechnung erfolgte nach den Angaben von Amer et al (2): 1mg Protein ≙ 9,09mg Gewebe Feuchtgewicht; PBA: Protein-Bindungs-Assay; EM: Enzymatische Methode

Tierart Autor	Messwert fmol cGMP/mg Feuchtgewicht	Messmethode	Literatur- stelle
Ratte			
Diese Arbeit	10	RIA	
Amer M.S	48	PBA	2
Ekblad E.B.M	22+	RIA	111
Fedchenko S.N	50	?	117
Ishikawa E.	34-40	EM	173
Ruoff H-J	20-30	PBA	271,276
Schwartzl E.H	13	RIA	302
Takakura J.	31+	RIA	356
Vesely D.L	1560+	RIA	375
Zarrindast M.	27	RiA	392
Hund			
Cheung L.Y	24-40	RIA	73,74
Eichhorn J.H	23-58	RIA	109,110
Levine R.A	9-17	RIA	198
	2- 6	RIA	199
Talev J.N	14	RIA	360
Thurston D.	4- 5	RIA	370
Meerschwein			
Canfield S.P	12-26	PBA	61,62
Ohe K.	100	RIA	239
Mensch			
Levine R.A	30	RIA	200
Talev J.N	23	RIA	360

Fortsetzung Tb 11

Kaninchen			
Kapadia C.R	$8^{+\ ++}$	RIA	181

Tb 11 Im Magenkorpus verschiedener Species gemessene cGMP-Homogenatspiegel
PBA, EM und $^{+}$: s. Tb 10; $^{++}$: Wert war nicht für Recovery korrigiert. Die Ø-Recovery betrug 59% → korrigierter Messwert = 14

Autor	Messwert fmol cAMP/ 10^6 Zellen	Messmethode	Literaturstelle
Rosenfeld G.C	700^{+}	RIA	266
Ruoff H-J	2000	PBA	272
Sonnenberg A.	450	RIA	342

Tb 12 In IZ aus dem Magenkorpus der Ratte gemessene cAMP-Spiegel
$^{+}$: in Anwesenheit von IBMX 200µmol/l gemessen

D Isolierung und Inkubation von Magenschleimhautzellen der Ratte

D.1 Zellisolierung

3 verschiedene Medien wurden verwendet: Medium A (mmol/l) NaH_2PO_4 0,5; Na_2HPO_4 1,0; $NaHCO_3$ 20; NaCl 70; KCl 5; Glukose 11; EDTA 2; HEPES 50 und Albumin aus Rinderserum 20mg/ml. Medium B hatte die gleiche Zusammensetzung wie Medium A, war aber EDTA-frei und enthielt zusätzlich $CaCl_2$ 1,0 und $MgCl_2$ 1,5. Medium C oder SP (=Standardpuffer) unterschied sich von Medium B durch eine reduzierte Albumin-Konzentration von 1mg/ml. Alle Medien wurden mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 1mol/l auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die Zellisolierung erfolgte nach der Methode von Lewin et al (201). Pro Experiment wurden 10-12 normal gefütterte weibliche Wistar Ratten (FW 49 Biberach, Gewicht 230-280g) durch einen Schlag auf den Kopf getötet. Die Mägen wurden entnommen, nach Abtrennung von Rumen und Antrum in "everted sacs" verwandelt, mit jeweils 2ml Pronase E-Lsg (11mg/ml) gefüllt und bei 37°C in Carbogen-begastem Medium A für 90min inkubiert, wobei dieses zweimal erneuert wurde. Die Säcke wurden dann in Medium B gebracht und vorsichtig 75min lang mit einem Magnetrührer gerührt. Die sich ablösenden IZ wurden durch Zentrifugation (230g, 5min) gesammelt, in SP aufgenommen, durch ein Nylon-Netz filtriert und bei 4°C aufbewahrt (=Zellgemisch).
Die Zellausbeute und der Anteil der PZ und der toten Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 320fach) unter Verwendung einer Türkschen Kammer bestimmt, wobei die PZ durch ihre charakteristischen morphologischen Merkmale und die toten Zellen durch Trypanblau-Aufnahme identifiziert werden konnten.
Die durchschnittliche Zellausbeute pro Ratte betrug $90,5 \pm 3,9 \times 10^6$ Zellen (E = 24), der durchschnittliche PZ-Gehalt 21,4 ± 0,9% (E = 35) und der Anteil an toten Zellen 5,5 ± 0,6% (E = 35).

D.2 Auftrennung des Zellgemisches in Fraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Die Auftrennung erfolgte durch isopyknische Zentrifugation wie von Sonnenberg et al (341) beschrieben. 2,5ml Zellgemisch (Zellkonzentration $\approx 10^7$/ml) wurden mit 4ml SP; 2,7ml Percoll und 0,8ml HEPES 250mmol/l vermischt (Dichte des resultierenden Mediums ≈ 1,03g/ml).

Nach 40min Zentrifugation bei 200g wurden drei Zellfraktionen erhalten: Eine PZ-angereicherte Fraktion [= PZ-Fraktion; PZ: 69,6 ± 2,5% mit 6,3 ± 0,7% toten Zellen (E = 8)] an der Oberfläche des Mediums, eine mittlere Fraktion [= M-Fraktion; PZ: 21,1 ± 2,0% mit 3,7 ± 0,5% toten Zellen (E = 7)] und ein Sediment [= U-Fraktion; PZ: 5,2 ± 0,2% mit 3,4 ± 0,6% toten Zellen (E = 7)]. Die Fraktionen wurden nach der Auftrennung zweimal mit SP gewaschen und danach bei 4°C bis zur Inkubation aufbewahrt.

D.3 Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden auf eine Konzentration von ≈ 2×10^7/ml eingestellt und im Wasserbad unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

D.3.1 Inkubation isolierter Zellen des Zellgemisches

D.3.1.1 Standard-Vorschrift

300µl Zellgemisch wurden 40min vorinkubiert, danach 100µl Testsubstanz zugesetzt und für die angegebene Zeit inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgte durch Abpipettieren von 200µl Zellsuspension zu 20µl $HClO_4$ 11N.

D.3.1.2 Testung Rezeptor-blockierender Substanzen

Zu 200µl Zellgemisch wurde der Antagonist in 50µl Lsg zupipettiert, das Gemisch 40min vorinkubiert und danach 50µl des Agonisten zugesetzt. Weitere Behandlung s. D.3.1.1.

D.3.2 Inkubation isolierter Zellen einzelner Zellfraktionen

300µl Zellsuspension wurden 40min vorinkubiert und danach 50µl Test-Lsg zupipettiert. Weitere Behandlung s. D.3.1.1.

D.3.3 Herstellung der Testlösungen

Die zu prüfenden Substanzen wurden in dem jeweiligen Inkubationsmedium gelöst.

E Verwendete Substanzen und Geräte

E.1 Verwendete Substanzen

Acetylcholin, Hydrochlorid Merck
Acetylsalicylsäure Serva
Adenosin Serva
Adenosin-3',5'-monophosphat,cyclisch (cAMP) Serva
Adenosin-5'-diphosphat, Dinatriumsalz (ADP) Serva
Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz (AMP) Serva
Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP) Serva
L-Adrenalin, Hydrogentartrat Fluka
Adrenochrom Sigma
Albumin aus Humanserum, lyophil. rein)98% Cohn Fraktion V (HSA) Serva
Albumin aus Rinderserum, lyophil. rein)92% Cohn Fraktion V Serva
Aluminiumoxid, 90 neutral (aktiver I n. Brockmann), für die Säulenchromatographie (Al_2O_3) Merck
Arachidonsäure Serva
Ascorbinsäure EABI, Universitätsapotheke Tübingen
Atropinsulfat Merck
Bariumchlorid Merck
Bernsteinsäureanhydrid, puriss. biochim. (BA) Fluka
Carbachol, Hydrochlorid Fluka
Carbenoxolon, Natriumsalz Homburg
Cimetidin Smith-Kline
L-(+)-Cystein, Hydrochlorid Merck
4-Dimethylaminoantipyrin Sigma
1,4-Dioxan, getrocknet (max. 0,01% Wasser) Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT) Serva
Dopamin (3-Hydroxytyramin), Hydrochlorid Serva
Ethanol,absolut Merck
1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, Hydrochlorid (EDC) Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA) Merck
Forskolin Calbiochem
Glucagon Serva
Guanosin Serva
Guanosin-3',5'-monophosphat,cyclisch (cGMP) Serva
Guanosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz (GMP) Serva
Guanosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (GTP) Serva

Hexoprenalinsulfat Byk Gulden
Histamin, Dihydrochlorid Fluka
Human-Calcitonin, synthetisch Ciba Geigy
Hydraziniumsulfat Merck
Hydrocortison, 21-Natriumsuccinat Sigma
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES) Serva
Hydroxylamin, Hydrochlorid Merck
Indometacin Sharp Dome
Insulin, vom Rind Hoechst
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) Serva
2-Mercaptoethanol Serva
Mepyraminmaleat Rhone-Poulenac
Naphazolin, Hydrochlorid Sigma
Natriumazid Merck
Natriumnitrit Merck
Natriumnitroprussid Merck
L-Noradrenalin, L-Hydrogentartrat Fluka
Pankreozymin, aus Schweinedarm Sigma
Pentagastrin (Gastrodiagnost) Merck
Percoll Pharmacia Fine Chemicals
Phentolamin, Hydrochlorid Ciba Geigy
L-Phenylephrin, Hydrochlorid Serva
Phosphodiesterase, aus Rinderherz Böhringer
Pilocarpin, Hydrochlorid Universitätsapotheke Tübingen
Proglumid Opfermann
Pronase E, 70000 PUK/g Merck
D,L-Propranolol, Hydrochlorid Sigma
Prostaglandin E_2 Sigma
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Serva
Relaxin, vom Schwein Frauenklinik Tübingen
Serotonin (5-Hydroxytryptamin), Hydrochlorid Sigma
Somatostatin Sigma
2'-O-Succinyl-adenosin-3',5'-monophosphat, cyclisch, freie Säure (ScAMP) Böhringer
2'-O-Succinyl-guanosin-3',5'-monophosphat, cyclisch, freie Säure (ScGMP) Böhringer
Theophyllin Merck
3,3',5'-Trijod-L-thyronin, Natriumsalz Sigma
Wasserstoffperoxid 30% EAB II, Universitätsapotheke Tübingen

E.2 Verwendete Geräte

Christ- Gefriertrockner Typ 200
Christ-Zentrifuge
Dialyseblöcke mit je 10 Kammern Biologie Applique
Dialysemembranen RC 53, 20x250mm Schleicher + Schüll
Dialyseschlauch Servapor (Durchmesser 10mm) Serva
Eppendorf-Multipette 4780 mit Combitips 0.5 und 2,5ml
Eppendorf-Pipetten 10, 50, 80, 100, 200 und 1000µl
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml
Eppendorf-Rotationsmischer 3300
Eppendorf-Zentrifuge
Minivials Zinsser Analytik
Pipetman 200µl Abimed
Plotter HP 9871A Hewlett Packard
RIA-Programm (Spline-Funktion) Berthold
Schüttler für 40 Dialyseblöcke (Frequenz 130/min)
Pharmakologisches Institut Tübingen
Tisch-Rechner HP 9825A Hewlett Packard
Automatischer Gamma-Probenwechsler Gammaszint BF 5300 Berthold

Firmenanschriften: Abimed, 4000 Düsseldorf 1; Beckmann, 8000 München 40; Berthold, 7547 Wildbad; Biologie Applique, Marseille (Frankreich); Böhringer, 6800 Mannheim 31; Byk Gulden, 7750 Konstanz; Calbiochem, 6300 Gießen; Ciba Geigy, 7867 Wehr; Eppendorf, 2000 Hamburg 65; Fluka, 7910 Neu-Ulm; Hewlett Packard, 7030 Böblingen; Hoechst, 6230 Frankfurt 80; Homburg, 6000 Frankfurt 1, Merck, 6100 Darmstadt; Opfermann, 5060 Bergisch-Gladbach 2; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Schweden); Rhone-Poulenac, Paris (Frankreich); Schleicher + Schüll, 3354 Dassel; Serva, 6900 Heidelberg; Sigma, 8028 Taufkirchen; Sharp Dome, 8000 München; Smith-Kline, 3400 Göttingen; Zinsser Analytik, 6000 Frankfurt 50

F Einfluß von Pharmaka auf den cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte

F.1 Basale cAMP- und cGMP-Spiegel

Basale cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ des Zellgemisches und einzelner Zellfraktionen sind in Tb 13 und 14 dargestellt.

Der cAMP-Spiegel blieb über 4h lang konstant (Tb 15).

Zellen, die anstatt bei 37°C bei 0°C inkubiert wurden, wiesen einen erniedrigten cAMP- und cGMP-Spiegel auf (Tb 16).

Inkubations-Medium	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
SP	377 ± 91 E= 3	7,38 ± 2,49 E= 3
SP + DTT 1mmol/l	299 ± 36 E= 4	7,38 ± 1,40 E= 3
SP + IBMX 1mmol/l	713 ± 93 E=10	11,10 ± 1,83 E=10
SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l	704 ± 64 E=10	18.45 ± 2,98 E= 8

Tb 13 cAMP - und cGMP-Spiegel der IZ des Zellgemisches in verschiedenen Inkubationsmedien

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
U	624 ± 21 n=38	8,87 ± 0,60 n=34
M	703 ± 21 n=39	19,82 ± 0,61 n=33
PZ	458 ± 27 n=21	14,31 ± 0,74 n=21

Tb 14 cAMP - und cGMP-Spiegel in Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%, M-Fraktion 23%, PZ-Fraktion 74%

S-P: V: E = 4; - cAMP: U ↔ M n.s; U ↔ PZ $p<0,0001$; M ↔ PZ $p<0,0001$; - cGMP: U ↔ M $p<0,0001$; U ↔ PZ $p<0,0001$; M ↔ PZ $p<0,0001$

Inkubations-Dauer min	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
15	545 ± 7 n=6
30	545 ± 11 n=6
45	548 ± 15 n=6
90	591 ± 23 n=6
120	572 ± 25 n=4
240	522 ± 19 n=6

Tb 15 Einfluß der Inkubationsdauer auf den basalen cAMP-Spiegel der IZ des Zellgemisches

Ink-M: SP + DTT 1mmol/l; PZ: 31%

S-P: G-t: cAMP: 15min ↔ andere Zeiten → alle n.s

Inkubations-Temperatur	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
0^oC	333 ± 8 n=14 100%	4,28 ± 0,43 n=7 100%
37^oC	421 ± 9**** n=11 126%	6,74 ± 1,22 n=5 157%

Tb 16 Einfluß der Inkubationstemperatur auf den basalen cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + DTT 1mmol/l; Ink-D: 15min; PZ: cAMP 26%; cGMP 21%
S-P: jeweils $0^oC \leftrightarrow 37^oC \rightarrow$ s. Tb; - V: E = 2; cAMP; - G-t: cGMP

F.1.1 Einfluß von Bestandteilen des Standardpuffers

F.1.1.1 HEPES

Inkubation von IZ in SP ohne HEPES führte zu einer signifikanten Erniedrigung des cAMP-Spiegels (Abb 34).

F.1.1.2 Calcium und Magnesium

Die cAMP-Spiegel von IZ, die ohne Calcium bzw ohne Calcium und Magnesium inkubiert wurden, lagen zu allen getesteten Zeiten signifikant unter den Kontrollwerten. Die Spiegel von IZ, die mit Calcium, aber ohne Magnesium inkubiert wurden, waren nach 15 und 120min nachweisbar erniedrigt (Abb 35).

F.1.1.3 Kalium

Kaliumchlorid 100mmol/l hatte keinen signifikanten Einfluß auf den basalen cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ (Tb 17).

Test-Substanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
Kontrolle	525 ± 12 n=4 100%	6,11 ± 0,36 n=4 100%
Kaliumchlorid 100mmol/l	627 ± 46 n=5 119%	7,60 ± 0,82 n=5 125%
PGF_2 1µmol/l	560 ± 28 n=5 107%	7,03 ± 1,07 n=4 115%
Arachidonsäure 1mmol/l	555 ± 32 n=5 106%	8,28 ± 1,23 n=5 136%
Pilocarpin 100µmol/l	604 ± 20^{xx} n=5 115%	7,69 ± 0,23^{x} n=4 126%
Acetylcholin 100µmol/l	578 ± 18 n=5 110%	7,34 ± 1,19 n=5 120%
Ephedrin 100µmol/l	584 ± 44 n=5 111%	9,30 ± 0,61^{xx} n=5 152%
Ethanol 120mmol/l	555 ± 10 n=5 106%	9,92 ± 1,28^{x} n=5 163%

Tb 17 Einfluß verschiedener Substanzen auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 19%; Parallel-Versuch
S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils X ↔ Testsubstanz → s. Tb

F.2 Extrazelluläres cAMP und cGMP

Der Anteil des extrazellulären cGMP betrug unter Basalbedingungen 11% und in Gegenwart von DTT 1mmol/l 24% (Zunahme n.s). Die entsprechenden cAMP-Werte beliefen sich auf 26 und 16%, wobei der extrazelluläre Spiegel unter dem Einfluß von DTT signifikant ($p<0,05$) erniedrigt war.

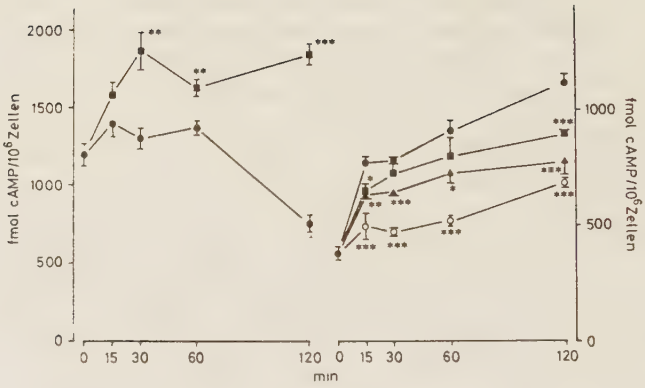


Abb 19 - links: Einfluß von HEPES auf den cAMP-Spiegel der IZ
■: SP (enthält HEPES 50mmol/l) + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; ●: SP ohne HEPES + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 39%
S-P: G-t: cAMP: jeweils SP ↔ SP ohne HEPES → s.Abb (n=5)

rechts: Einfluß von Calcium und Magnesium auf den cAMP-Spiegel der IZ
●: SP (enthält $CaCl_2$ 1mmol/l und $MgCl_2$ 1,5mmol/l) + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; ■: wie ●, aber ohne Magnesium; ▲: wie ●, aber ohne Calcium; o: wie ● aber, ohne Calcium und Magnesium; PZ: 30%; Probenbehandlung: Zellen wurden in Calcium- und Magnesium-freiem Medium B isoliert, in Medium o aufgenommen und danach mit den angegebenen Calcium- und Magnesiumkonzentrationen ohne Vorinkubation inkubiert.
S-P: G-t: cAMP: jeweils ● ↔ andere Medien → s. Abb (n=5)

F.3 Phosphodiesterase-Hemmstoffe

F.3.1 IBMX

IBMX 1mmol/l erhöhte den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ zu allen getesteten Inkubationszeiten signifikant gegenüber der Kontrolle, wobei beim cAMP nach 5min und beim cGMP nach 40min ein Plateau erreicht wurde (Abb 20). Eine nachweisbare Stimulation ergab sich für das cAMP ab einer IBMX-Konzentration von 1µmol/l ($EC_{50} \approx 120\mu mol/l$) und für

das cGMP ab einer Konzentration von 100µmol/l ($EC_{50} \approx 410$µmol/l). Die maximale Stimulation durch IBMX 1mmol/l betrug für das cAMP 124% und für das cGMP 98% des Kontrollwertes (Abb 21).

F.3.2 Vergleich IBMX - Theophyllin

IBMX 1mmol/l hatte zu allen geprüften Zeiten eine signifikant größere Wirkung auf den cAMP-Spiegel der IZ als Theophyllin 1mmol/l (Tb 18).

Inkubations-Dauer min	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen		
	Kontrolle	Theophyllin 1mmol/l	IBMX 1mmol/l
5	252 ± 11 n=6 100%	301 ± 13 n=5 120%	471 ± 15 n=6 187%
10	271 ± 6 n=6 100%	433 ± 20 n=5 160%	553 ± 23 n=5 204%
30	370 ± 46 n=6 100%	417 ± 32 n=6 113%	603 ± 12 n=6 163%
120	394 ± 30 n=6 100%	485 ± 16 n=4 123%	792 ± 27 n=4 201%

Tb 18 Vergleich der Wirkungen von IBMX und Theophyllin auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + DTT 1mmol/l; PZ: 19%; keine Vorinkubation
S-P: G-t: cAMP: Theo ↔ IBMX → mind. $p<0,01$ für alle Zeiten; K ↔ IBMX → $p<0,0001$ für alle Zeiten; K ↔ Theo → 5min $p<0,05$; 10min $p<0,001$; andere Zeiten n.s

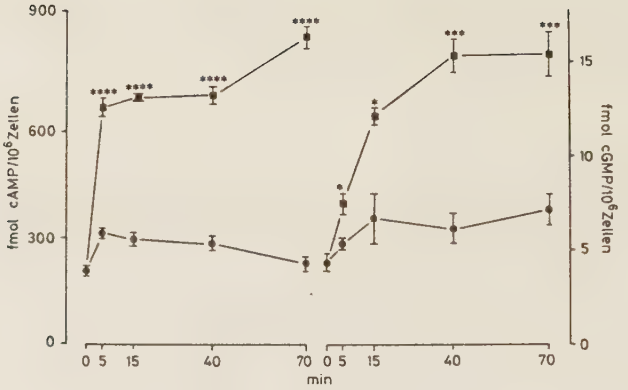


Abb 20 Zeitabhängigkeit der IBMX-Wirkung auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + DTT 1mmol/l; PZ: 21%; ●: Kontrolle; ■: IBMX 1mmol/l; Probenbehandlung: Die Zellen wurden nicht vorinkubiert; Parallel-Versuch; S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ IBMX → s. Abb (n=5); links: cAMP-Spiegel; rechts: cGMP-Spiegel

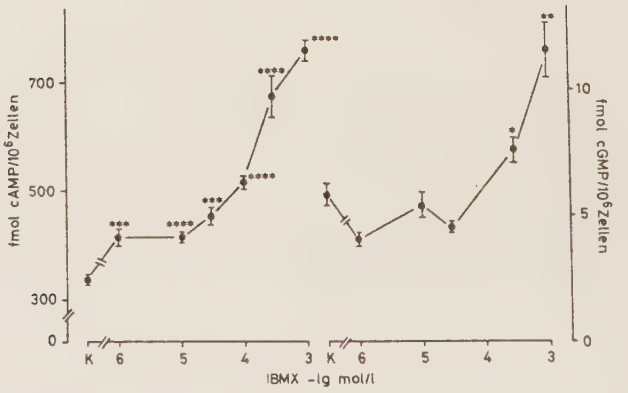


Abb 21 Konzentrationsabhängigkeit der IBMX-Wirkung auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + DTT 1mmol/l; Ink-D: 45min ohne Vorinkubation; PZ: 20%; Parallel-Versuch; S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ IBMX → s. Abb (n=5); links: cAMP-Spiegel; rechts: cGMP-Spiegel

F.4 Histamin

F.4.1 Einfluß von Histamin auf das Zellgemisch

Histamin 100µmol/l und 1mmol/l erhöhten den cAMP-Spiegel der IZ signifikant, wobei mit letzterer Konzentration nach 15min ein Plateau erreicht wurde, das für weitere 45min konstant blieb (Abb 22). Im Gegensatz dazu wurde der cGMP-Spiegel durch Histamin 100µmol/l nur nach 5, aber nicht nach 30min Inkubation signifikant erhöht (Tb 19).

Inkubations-Dauer min	Kontrolle	Histamin 100µmol/l
	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
40^{+}	712 ± 44 n=19 100%	1319 ± 48^{xxxx} n=15 185%
	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
5^{++}	5,41 ± 0,25 n=4 100%	9,59 ± 0,26^{xx} n=4 177%
30^{+++}	13,41 ± 1,52 n=5 100%	14,05 ± 1,12 n=5 105%

Tb 19 Einfluß von Histamin auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
$^{+}$: Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 23%; - $^{++}$: Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; PZ: 19%; - $^{+++}$: Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 21%
S-P: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ His → s. Tb; - $^{+}$: V: E = 3; - $^{++}$: V: E = 1; - $^{+++}$: G-t

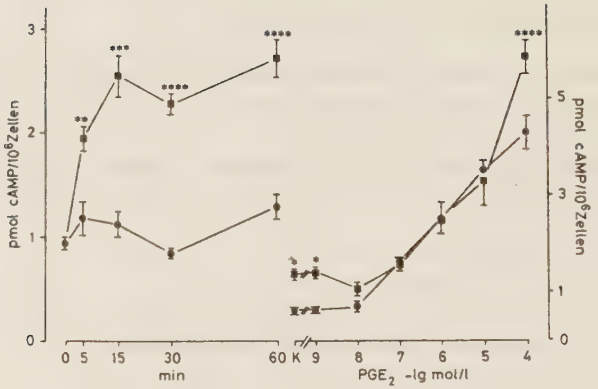


Abb 22 - links: Zeitabhängigkeit der Histamin-Wirkung auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 32%; ●: Kontrolle; ■: Histamin 1mmol/l
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ His → s. Abb (n=5)

rechts: Einfluß von PGE_2 auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; Ink-D: 40min; PZ: 20%; ●: PGE_2; ■: PGE_2 + Histamin 100µmol/l
S-P: V: E = 1; cAMP: jeweils PGE ↔ PGE + His → s. Abb; His-Effekt K ↔ His-Effekt + PGE → PGE 9 n.s; PGE 8 n.s; PGE 7 $p<0,05$; PGE 6 $p<0,05$; PGE 5 $p<0,01$

F.4.1.1 Interaktion Histamin - Somatostatin

IZ wurden mit Somatostatin allein oder mit Somatostatin und Histamin 100µmol/l inkubiert. Somatostatin hatte im Bereich von 1nmol/l bis 10µmol/l keinen Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel, konnte aber den Histamin-bedingten Anstieg in Konzentrationen von 100nmol/l und 10µmol/l signifikant hemmen. Die maximale Hemmung durch Somatostatin 10µmol/l betrug 38% (Abb 23).

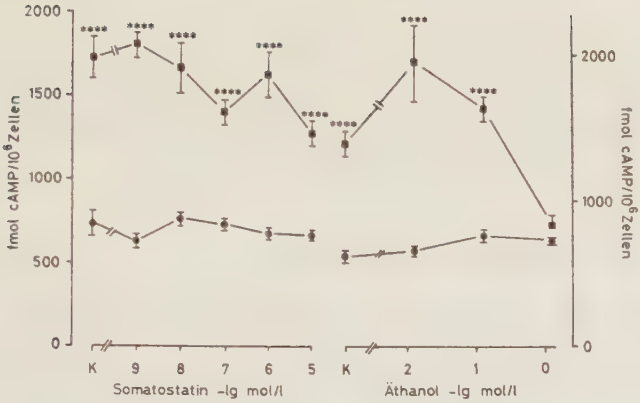


Abb 23 - links: Einfluß von Somatostatin auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; Ink-D: 40min; PZ: 28%; ●: Somatostatin; ■: Somatostatin + Histamin 100µmol/l
S-P: V: E = 1; cAMP: jeweils Som ↔ Som + His → s.Abb; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Som → Som 9 n.s; Som 8 n.s; Som 7 p<0,05; Som 6 n.s; Som 5 p<0,01

rechts: Einfluß von Ethanol auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M. SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; Ink-D: 40min; PZ: 20%; ●: Ethanol; ■: Ethanol + Histamin 100µmol/l
S-P: V: E = 1; cAMP: jeweils Eth ↔ Eth + His → s.Abb; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Eth → Eth 12mmol p<0,01; Eth 120mmol n.s; Eth 1,2mol p<0,001

F.4.1.2 Interaktion Histamin - PGE_2

In IZ, die mit PGE_2 allein oder mit PGE_2 und Histamin 100µmol/l inkubiert wurden, erhöhte PGE_2 den cAMP-Spiegel signifikant ab einer Konzentration von 100nmol/l (EC_{50} ≈ 870nmol/l), während es in Konzentrationen von 100nmol/l bis 10µmol/l den Histamin-bedingten cAMP-Anstieg vollständig zu blockieren vermochte (IC_{50} ≈ 12nmol/l, s. Abb 22).

F.4.1.3 Interaktion Histamin - Ethanol

Ethanol hatte in Konzentrationen von 12mmol/l bis 1,2mol/l (0,07 - 7 Volumen-%) keinen nachweisbaren Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel. Während Ethanol 12mmol/l den Einfluß von Histamin 100µmol/l auf den cAMP-Spiegel signifikant um 60% steigerte, führte Ethanol 1,2mol/l zu einer Hemmung des Histamin-Effektes um 87% (Abb 23).

F.4.1.4 Interaktion Histamin - Antihistaminika

IZ wurden ohne oder mit Cimetidin 10µmol/l bzw Mepyramin 10µmol/l vorinkubiert, und anschließend ein Teil der Proben mit Histamin 100µmol/l stimuliert. Während Cimetidin und Mepyramin keinen nachweisbaren Einfluß auf den basalen cAMP- und cGMP-Spiegel hatten, hemmte der H_2-Antagonist den Histamin-Effekt auf das zelluläre cAMP und cGMP signifikant um 66 bzw 61%. Mepyramin bewirkte eine nicht signifikante Reduzierung um 51 bzw 42% (Tb 20 und 21).

Vorinkubation	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Histamin 100µmol/l
Kontrolle	431 ± 29 n=5 100%	574 ± 29 n=5 133%
Mepyramin 10µmol/l	409 ± 29 n=5 100%	480 ± 29 n=5 117%
Cimetidin 10µmol/l	412 ± 29 n=5 100%	461 ± 29 n=5 112%

Tb 20 Einfluß von Antihistaminika auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 19%
S-P: V: E = 1; cAMP: basal ↔ His $p<0,01$; basal ↔ Cim n.s; basal ↔ Mep n.s; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Mep n.s; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Cim $p<0,05$

Vorinkubation	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Histamin 100µmol/l
Kontrolle	5,41 ± 0,88 n=4 100%	9,59 ± 0,88 n=4 177%
Mepyramin 10µmol/l	6,83 ± 0,79 n=5 100%	9,25 ± 0,79 n=5 135%
Cimetidin 10µmol/l	4,80 ± 0,79 n=5 100%	6,42 ± 0,88 n=4 134%

Tb 21 Einfluß von Antihistaminika auf den basalen und Histamin-stimulierten cGMP-Spiegel der IZ
Parallel-Versuch zu Tb 20; Ink-M, Ink-D und PZ: s. dort
S-P: V: E = 1; cGMP: basal ↔ His $p<0,01$; basal ↔ Cim n.s; basal ↔ Mep n.s; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Mep n.s: His-Effekt K ↔ His-Effekt + Cim $p<0,05$

F.4.2 Einfluß von Histamin auf einzelne Zellfraktionen

Während Histamin 100µmol/l den cAMP-Spiegel in der M- und PZ-Fraktion erhöhte, ergab sich eine signifikante Stimulation des cGMP-Spiegels nur in der U-Fraktion (Tb 22 und 23). Zwischen der Histamin-Wirkung auf das zelluläre cAMP und dem PZ-Gehalt der Präparationen bestand eine positive Korrelation ($k = 0,96$; $p<0,05$).

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Histamin 100 µmol/l
U	719 ± 29 n=15 100%	730 ± 29 n=15 102%
M	573 ± 47 n=10 100%	808 ± 50^{xx} n= 9 141%
PZ	571 ± 26 n= 7 100%	1194 ± 168^{xx} n=10 209%

Tb 22 Einfluß von Histamin auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%, M-Fraktion 29%, PZ-Fraktion 66%; S-P: cAMP: jeweils K ↔ His → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 2; - M-Fraktion: V: E = 2; - PZ-Fraktion: G-t

Zell-Fraktion	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Histamin 100 µmol/l
U	8,61 ± 0,50 n=29 100%	10,15 ± 0,50^{x} n=28 118%
M	10,44 ± 0,94 n=14 100%	9,04 ± 0,94 n=14 87%
PZ	24,03 ± 1,30 n= 6 100%	24,63 ± 2,52 n= 5 102%

Tb 23 Einfluß von Histamin auf die cGMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%, M-Fraktion 25%, PZ-Fraktion 66%; S-P: cGMP: jeweils K ↔ His → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 4; - M-Fraktion: V: E = 3; - PZ-Fraktion: G-t

F.4.2.1 Interaktion Histamin - andere Substanzen in der PZ-Fraktion

In 12 der PZ-Fraktion, die mit verschiedenen Substanzen allein oder in Kombination mit Histamin 100µmol/l inkubiert wurden, konnte der basale cAMP-Spiegel durch Histamin und Adrenalin signifikant erhöht werden (Tb 24).

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Histamin 100µmol/l
Kontrolle	571 ± 118 n= 7 100%	1194 ± 98 n=10 209%
Adrenalin 100µmol/l	1274 ± 139 n=5 223%	1520 ± 139 n=5 266%
Dopamin 100µmol/l	454 ± 139 n=5 80%	705 ± 139 n=5 123%
Glucagon 100nmol/l	675 ± 139 n=5 118%	1000 ± 139 n=5 175%
Trijodthyronin 1µmol/l	780 ± 139 n=5 137%	637 ± 139 n=5 112%
Adenosin 10nmol/l	693 ± 139 n=5 121%	1094 ± 139 n=5 192%
PGE_2 1µmol/l	781 ± 139 n=5 137%	1064 ± 139 n=5 186%

Tb 24 Einfluß verschiedener Substanzen auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der PZ-Fraktion
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 66%
S-P: V: E = 1; cAMP: basal ↔ His $p<0,0001$; basal ↔ Adr $p<0,001$; basal ↔ andere Substanzen → alle n.s; His-Effekt K ↔ His-Effekt + Testsubstanz → Tri $p<0,0001$; Adr $p<0,05$; Dop $p<0,05$; andere Substanzen, alle n.s

Der Histamin-Effekt wurde durch Trijodthyronin vollständig blockiert, durch Adrenalin und Dopamin signifikant um 60% reduziert. Die Hemmung durch PGE_2, Glucagon und Adenosin betrug 55, 48 und 36%, war jedoch nicht signifikant (Tb 24).

Forskolin 10µmol/l erhöhte den basalen cAMP-Spiegel um 870% und verstärkte den Histamin-Effekt signifikant um 1107% (Abb 24).

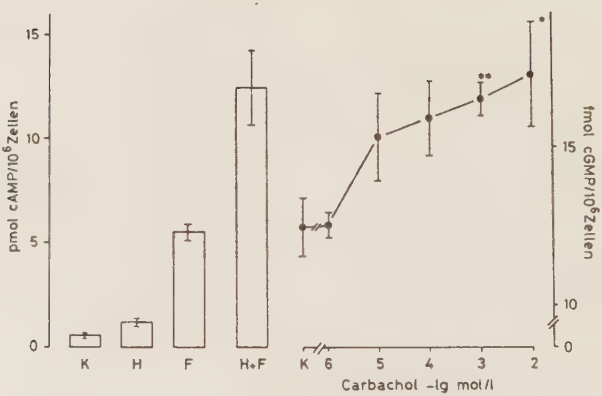


Abb 24 - links: Einfluß von Forskolin auf den basalen und Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel der PZ-Fraktion
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 66%; K: Kontrolle; H: Histamin 100µmol/l; F: Forskolin 10µmol/l; H+F: Histamin 100µmol/l + Forskolin 10µmol/l
S-P: U: E = 1; cAMP: K ↔ For $p<0,001$; His-Effekt K ↔ His-Effekt + For $p<0,0001$

rechts: Konzentrationsabhängigkeit der Carbachol-Wirkung auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%
S-P: G-t: cGMP: K ↔ Car → s. Abb (n=5)

F.5 Cholinerge Substanzen

F.5.1 Einfluß cholinerger Substanzen auf das Zellgemisch

F.5.1.1 Carbachol

In Anwesenheit von IBMX 1mmol/l erhöhte Carbachol 100µmol/l den cAMP-Spiegel der IZ nach 5 und 30min Inkubation signifikant, während es ohne IBMX keine nachweisbare Wirkung auslöste (Tb 25). Der Carbachol-Effekt auf das zelluläre cAMP konnte durch Vorinkubation der Zellen mit Atropin 10µmol/l blockiert werden (Tb 26).

Inkubations-Dauer min	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 100µmol/l
	mit IBMX 1mmol/l	
5^{+}	1024 ± 49 n=10 100%	1196 ± 49^{x} n=10 117%
30^{++}	738 ± 29 n=10 100%	837 ± 29^{xxx} n=10 113%
	ohne IBMX	
5^{+++}	567 ± 17 n= 5 100%	574 ± 17 n= 5 101%

Tb 25 Einfluß von Carbachol auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: $^{+}$ = SP + IBMX 1mmol/l; $^{++}$ = SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; $^{+++}$ = SP; PZ: $^{+}$ = 20%; $^{++}$ = 26%; $^{+++}$ = 19%; S-P: cAMP: jeweils K ↔ Car → s. Tb; – $^{+}$: V: E = 2; – $^{++}$: V: E = 2; – $^{+++}$: G-t

Die Wirkung auf den cGMP-Gehalt war konzentrations- und zeitabhängig. In Anwesenheit von IBMX 1mmol/l führte Carbachol nach 5 und 30min, aber nicht nach 15min, zu einer signifikanten Erhöhung des cGMP-Spiegels (Tb 27 und 28). Eine Stimulation war dabei ab einer Konzentration von 10µmol/l zu beobachten (Abb 24). Ohne IBMX hatte Car-

bachol 100µmol/l keinen nachweisbaren Einfluß auf das cGMP.

Vorinkubation	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 100µmol/l
Kontrolle	431 ± 20 n=5 100%	622 ± 20 n=5 145%
Atropin 10µmol/l	487 ± 23 n=4 113%	445 ± 20 n=5 103%

Tb 26 Einfluß von Atropin auf den basalen und Carbachol-stimulierten cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 19%
S-P: V: E = 1; cAMP: basal ↔ Car p<0,0001; basal ↔ Atr n.s; Car-fekt K ↔ Car-Effekt + Atr p<0,0001

Inkubations-Dauer min	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 100µmol/l
5	17,38 ± 1,12 n=15 100%	23,13 ± 1,12$^{\#\#}$ n=15 133%
15	10,53 ± 0,48 n= 7 100%	9,10 ± 0,42$^{\#}$ n= 8 86%
30	11,36 ± 0,55 n=15 100%	14,81 ± 0,57$^{\#\#\#}$ n=14 130%

Tb 27 Zeitabhängigkeit der Wirkung von Carbachol 100µmol/l auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 19%
S-P: cGMP: jeweils K ↔ Car → s. Tb; - 5min: V: E = 3; - 15min: V: E = 2; - 30min: V: E = 3

Inkubations-Dauer	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 1mmol/l
5	12,46 ± 0,90 n=5 100%	16,54 ± 0,48^{xx} n=4 133%
15	15,20 ± 0,58 n=3 100%	15,90 ± 1,11 n=4 105%
30	14,42 ± 0,73 n=5 100%	18,14 ± 1,17^{x} n=5 126%

Tb 28 Zeitabhängigkeit der Wirkung von Carbachol 1mmol/l auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l: PZ: 20%
S-P: G-t: cGMP: jeweils X ↔ Car → s. Tb

F.5.1.2 Pilocarpin und Acetylcholin

Pilocarpin 100µmol/l bewirkte eine signifikante Erhöhung des zellulären cAMPs und cGMPs um 15 bzw 26% (Tb 17). Dagegen war der unter Acetylcholin 100µmol/l beobachtete Anstieg der Nukleotid-Spiegel nicht signifikant (Tb 17).

F.5.1.3 Interaktion Carbachol - DTT

IZ wurden ohne oder mit DTT 100µmol/l bzw 1mmol/l vorinkubiert und danach ein Teil der Proben mit Carbachol bzw Adrenalin (s. Kap F.7.1.5) stimuliert (Tb 29 und Abb 30). Während DTT 100µmol/l keine nachweisbare Wirkung aufwies, erhöhte DTT 1mmol/l den basalen cGMP-Spiegel nach 5 und 30min deutlich. Der Carbachol-Effekt auf das zelluläre cGMP wurde durch beide DTT-Konzentrationen nicht signifikant beeinflußt.

Vorinkubation	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 1mmol/l
Kontrolle	6,98 ± 1,02 n=5 100%	8,62 ± 1,02 n=5 123%
DTT 100µmol/l	8,14 ± 1,02 n=5 100%	8,91 ± 1,13 n=4 109%
DTT 1mmol/l	18,14 ± 1,02 n=5 100%	22,50 ± 1,02 n=5 122%

Tb 29 Einfluß von DTT auf den basalen und Carbachol-stimulierten cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%; S-P: V: E = 1; cGMP: basal ↔ DTT 100µmol n.s; basal ↔ DTT 1mmol p<0,0001; Car-Effekt K ↔ Car-Effekt + DTT → DTT 100µM n.s; DTT 1mM n.s

F.5.1.4 Interaktion Carbachol - Calcium

IZ wurden ohne oder mit den in der Abb 31 angegebenen Calcium-Konzentrationen vorinkubiert, und danach ein Teil der Proben mit Adrenalin 100µmol/l bzw Carbachol 100µmol/l stimuliert. Calcium hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel, reduzierte aber den basalen cGMP-Spiegel in einer Konzentration von 4mmol/l signifikant auf 63% des Kontrollwertes. Der Carbachol-Effekt auf das zelluläre cGMP wurde durch Calcium-Konzentrationen von 1 und 2mmol/l und durch EDTA 1mmol/l signifikant gegenüber der Kontrolle ohne Calcium verringert (Tb 39).

F.5.2 Einfluß cholinerger Substanzen auf einzelne Zellfraktionen

Carbachol 100µmol/l hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die cAMP-Spiegel der einzelnen Zellfraktionen, erhöhte aber den cGMP-Spiegel in der U-Fraktion signifikant um 29%.

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 100µmol/l
U	690 ± 43 n=15 100%	777 ± 43 n=15 113%
M	560 ± 19 n=19 100%	563 ± 20 n=18 101%
PZ	388 ± 20 n=10 100%	432 ± 21 n= 9 111%

Tb 30 Einfluß von Carbachol auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 25%; PZ-Fraktion 74%; S-P: cAMP: jeweils K ↔ Car → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 2; - M-Fraktion: V: E = 3; - PZ-Fraktion: V: E = 2;

Zell-Fraktion	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Carbachol 100µmol/l
U	6,51 ± 0,49 n=19 100%	8,37 ± 0,54* n=17 129%
M	10,53 ± 0,52 n=18 100%	10,40 ± 0,50 n=19 99%
PZ	6,74 ± 0,51 n=10 100%	7,84 ± 0,54 n= 9 116%

Tb 31 Einfluß von Carbachol auf die cGMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M, Ink-D und PZ: s. Tb 30; S-P: cGMP: jeweils K ↔ Car → s. Tb: - U-Fraktion: V: E = 3; - M-Fraktion: V: E = 3; - PZ-Fraktion: V: E = 2

F.6 Pentagastrin

F.6.1 Einfluß von Pentagastrin auf das Zellgemisch

Pentagastrin 100nmol/l erhöhte den cAMP-Spiegel der IZ nach 5min signifikant um 31%, während Pentagastrin 1µmol/l nach 30min keine nachweisbare Wirkung hatte. Das zelluläre cGMP zeigte unter diesen Bedingungen nur einen geringfügigen Anstieg (Tb 32 und 33).

F.6.2 Einfluß von Pentagastrin auf einzelne Zellfraktionen

Eine signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Pentagastrin war nur in der M-, aber nicht in der U- oder PZ-Fraktion nachweisbar (Tb 34).

Inkubations-Dauer min	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Pentagastrin
		100nmol/l
5^{+}	677 ± 19 n=10 100%	886 ± 34**** n= 5 131%
		1µmol/l
30^{++}	777 ± 20 n= 5 100%	802 ± 17 n= 4 103%

Tb 32 Einfluß von Pentagastrin auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: $^{+}$ = SP + IBMX 1mmol/l; $^{++}$ = SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l;
PZ: $^{+}$ = 19%; $^{++}$ = 21%; Parallel-Versuch zu Tb 33
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ Pen → s.Tb

Inkubations-Dauer min	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Pentagastrin
		100nmol/l
5^{+}	11,50 ± 0,97 n=7 100%	12,82 ± 1,02 n=5 111%
		1µmol/l
30^{++}	13,41 ± 1,52 n=5 100%	15,71 ± 1,11 n=4 117%

Tb 33 Einfluß von Pentagastrin auf den cGMP-Spiegel der IZ
Parallel-Versuch zu Tb 32; Ink-M und PZ: s. dort
S-P: G-t: cGMP: jeweils K ↔ Pen → s.Tb

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Pentagastrin 100nmol/l
U	575 ± 27 n=14 100%	537 ± 19 n=14 93%
M	1087 ± 59 n=15 100%	1270 ± 47^{x} n=15 117%
PZ	621 ± 65 n= 6 100%	642 ± 54 n= 8 104%

Tb 34 Einfluß von Pentagastrin auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 17%; PZ-Fraktion 75%
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ Pen → s. Tb

F.7 Adrenerge Substanzen

F.7.1 Einfluß adrenerger Substanzen auf das Zellgemisch

F.7.1.1 Substanzen mit vorwiegend α-sympathomimetischer Wirkung

Phenylephrin

Phenylephrin 100µmol/l erhöhte den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ bei Inkubation in SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l zu allen geprüften Inkubationszeiten signifikant (Abb 25). Dagegen hatten Konzentrationen von 10µmol/l bis 1mmol/l bei Verwendung eines entsprechenden Mediums ohne DTT keinen nachweisbaren Einfluß auf das zelluläre cAMP (Abb 26), während der cGMP-Gehalt auch unter diesen Bedingungen durch Phenylephrin 10µmol/l um 47% signifikant ($p<0,001$) angehoben wurde. Eine Zusammenfassung der Phenylephrin-Wirkungen findet sich in Tb 35 und 36.

Noradrenalin

In Konzentrationen ab 100µmol/l erhöhte Noradrenalin den cAMP-Spiegel der IZ signifikant ($EC_{50} \approx 50$µmol/l) (Abb 26). Die Wirkung auf den cGMP-Spiegel war ab einer Konzentration von 1µmol/l signifikant und wurde auch durch höhere Konzentrationen nicht mehr weiter gesteigert (Abb 26). Eine Zusammenfassung der Noradrenalin-Wirkungen findet sich in Tb 35 und 36.

Naphazolin

Naphazolin 100µmol/l hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ (Tb 35 und 36).

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	basal	stimuliert
Phenylephrin 100µmol/l $^{+}$	888 ± 47 n=10 100%	1409 ± 47$^{\#\#\#\#}$ n=10 159%
Noradrenalin 100µmol/l $^{++}$	682 ± 26 n=20 100%	1090 ± 39$^{\#\#\#\#}$ n= 9 160%
Naphazolin 100µmol/l $^{+++}$	571 ± 37 n= 9 100%	670 ± 34 n=10 117%

Tb 35 Einfluß von α-Sympathomimetika auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: $^{+}$ = SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; $^{++}$ und $^{+++}$ = SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: $^{+}$ = 30min; $^{++}$ = 15min; $^{+++}$ = 5min; PZ: $^{+}$ = 19%; $^{++}$ = 22%; $^{+++}$ = 19%
S-P: jeweils V: E = 2; cAMP: basal ↔ stimuliert → s. Tb

Testsubstanz	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	basal	stimuliert
Phenylephrin 100µmol/l $^{+}$	18,45 ± 1,28 n=10 100%	23,13 ± 1,36$^{\#}$ n= 9 125%
Noradrenalin 100µmol/l $^{++}$	9,61 ± 0,32 n=20 100%	11,17 ± 0,46$^{\#\#}$ n=10 116%
Naphazolin 100µmol/l $^{+++}$	11,32 ± 1,22 n=19 100%	12,96 ± 1,32 n=17 114%

Tb 36 Einfluß von α-Sympathomimetika auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M, Ink-D und PZ: s. Tb 35
S-P: cGMP: jeweils basal ↔ stimuliert → s. Tb; - $^{+}$: V: E = 2; - $^{++}$: V: E = 2; - $^{+++}$: V: E = 3

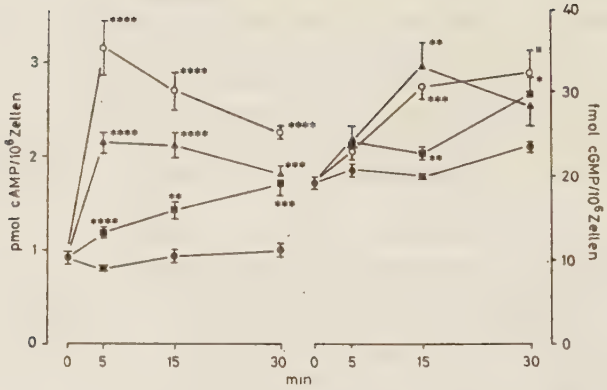


Abb 25 Zeitabhängigkeit der Wirkung adrenerger Substanzen
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; PZ: 18%; ●: Kontrolle; ■: Phenylephrin 100µmol/l; ▲: Adrenalin 100µmol/l; o: Hexoprenalin 100µmol/l; Parallel-Versuch; S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Abb (n=5); links: cAMP-Spiegel; rechts: cGMP-Spiegel

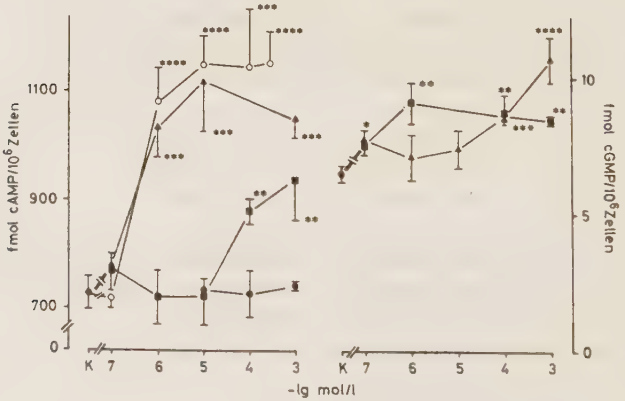


Abb 26 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung adrenerger Substanzen
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 15min; PZ: 25%; ●: Phenylephrin; ■: Noradrenalin; ▲: Adrenalin; o: Hexoprenalin; Parallel-Versuch; S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Abb (n=5)
links: cAMP-Spiegel; rechts: cGMP-Spiegel

F.7.1.2 Substanzen mit vorwiegend ß-sympathomimetischer Wirkung

Adrenalin

Adrenalin 100µmol/l erhöhte den cAMP-Spiegel der IZ bei Inkubation in SP + IBMX 1mmol/l (mit oder ohne DTT 1mmol/l) (Tb 37) zu allen getesteten Zeiten signifikant, wobei das Maximum der Stimulation nach 5min erreicht wurde (Abb 25). Eine Stimulation des cGMP-Spiegels (Tb 38) ergab sich nach 15 und 30min (Abb 25). Adrenalin-Konzentrationen von 1µmol/l oder größer erhöhten den cAMP-Spiegel signifikant (EC_{50} ≈ 390nmol/l) (Abb 26). Konzentrationen um 100µmol/l waren erforderlich um den cGMP-Gehalt anzuheben (Abb 26).

Testsubstanz	Inkubations-Medium	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
		basal	stimuliert
Adrenalin 100µmol/l	mit DTT $^{+}$	698 ± 29 n=20 100%	1267 ± 30 n=39 182% p<0,0001
	ohne DTT $^{++}$	880 ± 59 n=14 100%	1523 ± 54 n=15 173% p<0,0001
Hexoprenalin 100µmol/l	mit DTT $^{+++}$	943 ± 65 n= 5 100%	2684 ± 205 n= 5 285% p<0,0001
	ohne DTT $^{++++}$	727 ± 29 n=10 100%	1144 ± 109 n= 5 157% p<0,001

Tb 37 Einfluß von ß-Sympathomimetika auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l mit oder ohne DTT 1mmol/l; Ink-D: $^{+}$ = 30min; $^{++}$, $^{+++}$ und $^{++++}$ = 15min; PZ: $^{+}$ und $^{++}$ = 20%; $^{+++}$ = 18%; $^{++++}$ = 25%; S-P: cAMP: jeweils basal ↔ stimuliert → s. Tb; - $^{+}$: V: E = 4; - $^{++}$: V: E = 2; - $^{+++}$: G-t; - $^{++++}$: G-t;

Ohne IBMX konnte Adrenalin 100µmol/l keinen nachweisbaren Anstieg der cyclischen Nukleotidspiegel bewirken (Abb 28).

Hexoprenalin

Hexoprenalin 100µmol/l erhöhte den cAMP-Spiegel der IZ zu allen geprüften Zeiten und den cGMP-Spiegel nach 15 und 30min (Abb 25, Tb 37 und 38). Die Wirkung auf das zelluläre cAMP war ab Konzentrationen von 1µmol/l signifikant. Das Maximum der cAMP-Stimulation wurde mit 10µmol/l erreicht ($EC_{50} \approx$ 415nmol/l).

Testsubstanz	Inkubations-Medium	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
		basal	stimuliert
Adrenalin 100µmol/l	mit DTT $^{+}$	23,18 ± 1,00 n=20 100%	30,28 ± 1,03 n=19 131% p<0,0001
	ohne DTT $^{++}$	8,97 ± 0,43 n=24 100%	11,51 ± 0,46 n=20 128% p<0,001
Hexoprenalin 100µmol/l	mit DTT $^{+++}$	19,99 ± 0,24 n= 5 100%	30,77 ± 1,42 n= 5 154% p<0,0001
	ohne DTT $^{++++}$	6,44 ± 0,34 n=10 100%	10,32 ± 0,47 n= 4 160% p<0,01

Tb 38 Einfluß von ß-Sympathomimetika auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M, Ink-D und PZ: s. Tb 37
S-P: cGMP: jeweils basal ↔ stimuliert → s. Tb; - $^{+}$: V: E = 4; - $^{++}$: V: E = 3; - $^{+++}$: G-t; - $^{++++}$: G-t

F.7.1.3 Substanzen mit vorwiegend indirekt sympathomimetischer Wirkung: Ephedrin

In IZ führte Ephedrin 100µmol/l zu einer signifikanten Erhöhung des cGMP-, aber nicht des cAMP-Spiegels, um 52% (Tb 17).

F.7.1.4 Interaktion adrenerge Substanzen - adrenerge Rezeptorenblocker

F.7.1.4.1 Einfluß adrenerger Rezeptorenblocker auf basale cAMP- und cGMP-Spiegel

Während Propranolol in Konzentrationen von 10nmol/l bis 10µmol/l keinen nachweisbaren Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel der IZ hatte, wurde der basale cGMP-Spiegel durch Propranolol 10µmol/l signifikant um 20% erniedrigt (Abb 27). Phentolamin 300nmol/l führte ebenfalls zu einer Erniedrigung des basalen cGMP-Spiegels um 20%. Der cAMP-Spiegel wurde durch die geprüften Konzentrationen nicht wesentlich beeinflußt (Abb 27 und 29).

F.7.1.4.2 Interaktion Adrenalin - adrenerge Rezeptorenblocker

Propranolol hemmte den Adrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel konzentrationsabhängig ($IC_{50} \approx$ 120nmol/l). Eine vollständige Blockade wurde durch Propranolol 10µmol/l erreicht. Der Adrenalin-Effekt auf das zelluläre cGMP wurde durch Propranolol 10µmol/l dagegen signifikant vergrößert (Abb 27). Der α-Rezeptorenblocker Phentolamin beeinflußte den Adrenalin-Effekt auf den cAMP- und cGMP-Spiegel nicht nachweisbar (Abb 27). Bei Inkubation der Zellen ohne IBMX wurde der Adrenalin-Effekt auf das zelluläre cAMP sowohl durch Propranolol als auch durch Phentolamin blockiert, jedoch waren die gemessenen Veränderungen unter diesen Bedingungen geringfügig und weder die Stimulation durch Adrenalin noch deren Hemmung durch die beiden Antagonisten signifikant (Abb 28). Ohne IBMX wurde auch der Adrenalin-stimulierte cGMP-Spiegel nicht nachweisbar beeinflußt (Abb 28).

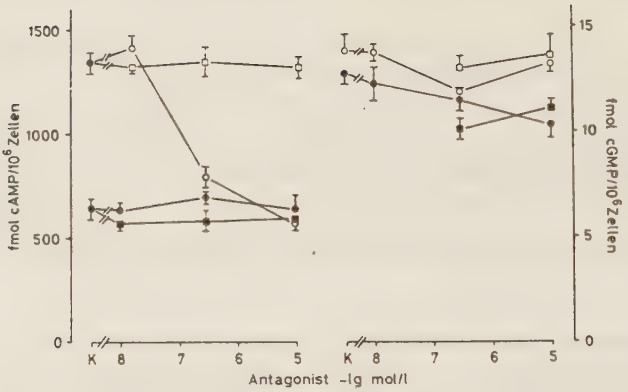


Abb 27 Einfluß adrenerger Rezeptorenblocker auf die basalen und Adrenalin-stimulierten Spiegel der cyclischen Nukleotide
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 15min; PZ: 19%; ●: Propranolol; o: Propranolol + Adrenalin 100µmol/l; ■: Phentolamin; □: Phentolamin + Adrenalin 100µmol/l; Probenbehandlung: Zellen wurden ohne oder mit Propranolol bzw Phentolamin vorinkubiert und danach ein Teil der Proben mit Adrenalin 100µmol/l stimuliert; Parallel-Versuch
links: cAMP-Spiegel: S-P: V: E = 1; cAMP: basal ↔ Pro → Pro 8, Pro 3x7 und Pro 5, alle n.s; basal ↔ Phe → Phe 8, Phe 3x7 und Phe 5, alle n.s; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + Pro → Pro 8 n.s; Pro 3x7 $p<0,0001$; Pro 5 $p<0,0001$; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + Phe → Phe 8, Phe 3x7 und Phe 5, alle n.s
rechts: cGMP-Spiegel: S-P: V: E = 1; cGMP: basal ↔ Pro → Pro 8 n.s Pro 3x7 n.s; Pro 5 $p<0,01$; basal ↔ Phe → Phe 3x7 $p<0,05$; Phe 5 n.s; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + Pro → Pro 8 n.s; Pro 3x7 n.s; Pro 5 $p<0,05$; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + Phe → Phe 3x7 n.s; Phe 5 n.s

F.7.1.4.3 Interaktion Noradrenalin - Phentolamin

Phentolamin 300nmol/l und 10µmol/l reduzierten den Noradrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel signifikant um 34 bzwe 42%. Phentolamin 300nmol/l führte außerdem zu einer nachweisbaren Vergrößerung des Noradrenalin-Effektes auf das zelluläre cGMP (Abb 29).

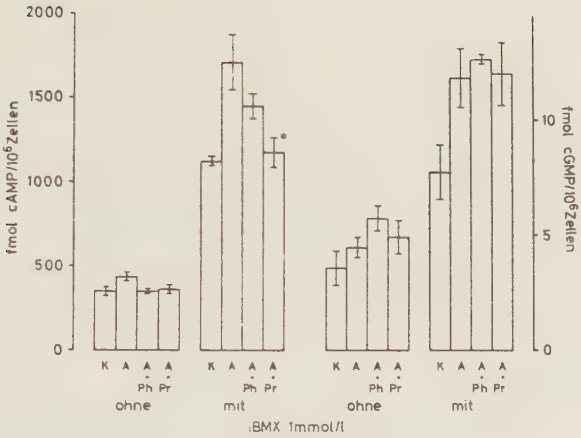


Abb 28 Einfluß adrenerger Rezeptorenblocker auf den Adrenalin-stimulierten cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ bei Inkubation mit oder ohne IBMX

Ink-D: 15min; PZ: 19%; K: Kontrolle; A: Adrenalin 100µmol/l; A + Ph: Adrenalin 100µmol/l + Phentolamin 300nmol/l; A + Pr: Adrenalin 100µmol/l + Propranolol 300nmol/l; Probenbehandlung: Zellen einer Präparation wurden in SP oder in SP + IBMX 1mmol/l aufgenommen und dann wie in der Leg zu Abb 27 beschrieben weiterbehandelt; Parallel-Versuch

S-P: G-t: cAMP und cGMP: Adr ↔ Adr + Phe und Adr ↔ Adr + Pro → s. Abb

links: cAMP-Spiegel

rechts: cGMP-Spiegel

F.7.1.5 Interaktion Adrenalin - DTT

Probenbehandlung s. Kap F.5.1.3. DTT 100µmol/l und DTT 1mmol/l führten zu einer signifikanten Reduzierung des Adrenalin-Effektes auf den cAMP-Spiegel um 44 bzw 49%. Der Adrenalin-Effekt auf den cGMP-Spiegel wurde dagegen nicht wesentlich beeinflußt (Abb 30). Bezüglich der Interaktion von DTT mit Carbachol s. Kap. F.5.1.3

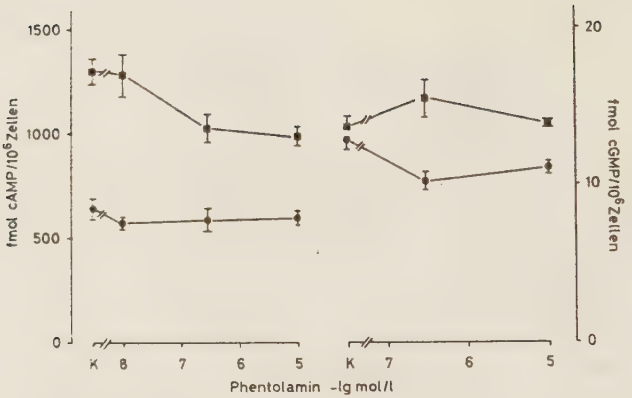


Abb 29 Einfluß von Phentholamin auf den basalen und Noradrenalin-stimulierten cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 15min; PZ: 19%; ●: Phentholamin; ■: Noradrenalin 100µmol/l + Phentolamin; Probenbehandlung: s. Leg Abb 27; Parallel-Versuch
links: cAMP-Spiegel: S-P: V: E = 1; cAMP: Nor-Effekt X ↔ Nor-Effekt + Phe → Phe 8 n.s; Phe 3x7 $p<0,01$; Phe 5 $p<0,001$
rechts: cGMP-Spiegel: S-P: V: E = 1; cGMP: Nor-Effekt X ↔ Nor-Effekt + Phe → Phe 3x7 $p<0,001$; Phe 5 n.s

F.7.1.6 Interaktion Adrenalin - Calcium

Probenbehandlung s. Kap. F.5.1.4. Der Adrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel wurde durch Calcium 1mmol/l nachweislich im Vergleich zur Kontrolle ohne Calcium vergrößert. Das gleiche galt für die Verstärkung des Adrenalin-Effektes auf das zelluläre cGMP durch Calcium 1 und 4mmol/l. EDTA 1mmol/l, das zu einer signifikanten Stimulation des basalen cAMP- und zu einer nicht signifikanten Erhöhung des basalen cGMP-Spiegels führte, hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die Adrenalin-Effekte (Tb 39).

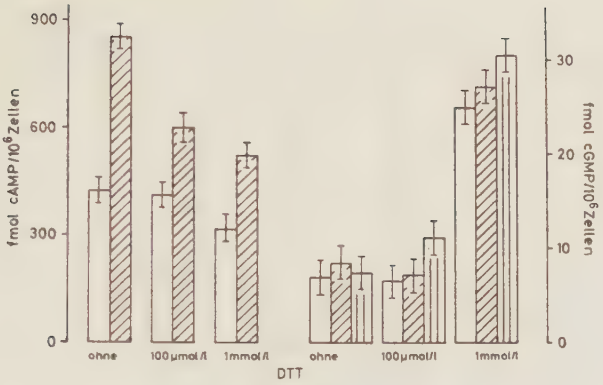


Abb 30 Einfluß von DTT auf die basalen und Adrenalin-stimulierten Spiegel der cyclischen Nukleotide in IZ

Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 30min; PZ: 20%; □: Kontrolle; ▨: Adrenalin 100µmol/l; ▩: Carbachol 1mmol/l; Parallel-Versuch; links: cAMP-Spiegel: - S-P: V: E = 1; cAMP: basal ↔ DTT 100µmol n.s; basal ↔ DTT 1mmol n.s; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + DTT → DTT 100µmol $p<0,001$; DTT 1mmol $p<0,001$; rechts: cGMP-Spiegel: - S-P: V: E = 1; cGMP: basal ↔ DTT 100µmol n.s; basal ↔ DTT 1mmol $p<0,0001$; Adr-Effekt K ↔ Adr-Effekt + DTT → DTT 100µmol n.s; DTT 1mmol n.s; Car-Effekt K ↔ Car-Effekt + DTT → DTT 100µmol n.s; Car 1mmol n.s

Vorinkubation Calcium-Konzentration mmol/l	Substanz-Effekt Δfmol/10^6 Zellen					
	Adrenalin 100µmol/l				Carbachol 100µmol/l	
	cAMP-Spiegel		cGMP-Spiegel		cGMP-Spiegel	
0	373	100%	7,17	100%	7,29	100%
1	537*	144%	14,14*	197%	0,70*	10%
2	406	109%	9,67	135%	-1,37**	-19%
4	310	83%	13,64*	190%	3,12	43%
0+EDTA1mmol/l	429	115%	9,31	130%	-2,08**	-29%

Tb 39 Einfluß von Calcium auf den Adrenalin- und Carbachol-Effekt

Ink-M, Ink-D und PZ: s. Abb 31; S-P: V: E = 1; cAMP und cGMP: jeweils Substanz-Effekt ohne Calcium ↔ Substanz-Effekt + Calcium → s. Tb

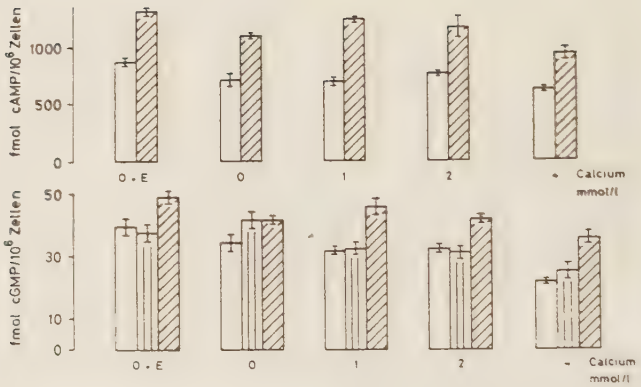


Abb 31 Einfluß von Calcium auf die basalen und Adrenalin- bzw Carbachol-stimulierten Spiegel der cyclischen Nukleotide in IZ
Ink-M: SP (ohne Calcium) + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l; Ink-D: 30min; PZ: 22%; □: Kontrolle; ▨: Adrenalin 100µmol/l; ▩: Carbachol 100µmol/l; E: EDTA 1mmol/l; Parallel-Versuch
oben: cAMP-Spiegel: - S-P: V: E = 1; cAMP: Cal 0 ↔ Cal 1mmol n.s; Cal 0 ↔ Cal 2mmol n.s; Cal 0 ↔ Cal 4mmol n.s; Cal 0 ↔ Cal 0 + EDTA p<0,05
unten: cGMP-Spiegel: - S-P: V: E = 1; cGMP: Cal 0 ↔ Cal 1mmol n.s; Cal 0 ↔ Cal 2mmol n.s; Cal 0 ↔ Cal 4mmol p<0,0001; Cal 0 ↔ Cal 0 + EDTA n.s
Die S-P für die Agonisten-Effekte finden sich in Tb 39.

F.7.2 Einfluß von Adrenalin auf einzelne Zellfraktionen

Adrenalin 100µMol/l erhöhte den cAMP-Gehalt in allen Zellfraktionen und den cGMP-Gehalt in der U- und M-Fraktion signifikant (Tb 40 und 41). Die Stimulierbarkeit des cAMP-Spiegels durch Adrenalin korrelierte negativ mit dem PZ-Gehalt der Zellpräparationen (k = -0,98; p<0,05).

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Adrenalin 100µmol/l
U	539 ± 75 n= 9 100%	1813 ± 71^{xxxx} n=10 336%
M	602 ± 71 n=10 100%	1941 ± 71^{xxxx} n=10 323%
PZ	504 ± 70 n=12 100%	1169 ± 76^{xxxx} n=10 232%

Tb 40 Einfluß von Adrenalin auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 17%; PZ-Fraktion 68%; S-P: cAMP: jeweils K ↔ Adr → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 1; - M-Fraktion: V: E = 1; - PZ-Fraktion: V: E = 2

Zell-Fraktion	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Adrenalin 100µmol/l
U	12,22 ± 0,53 n=20 100%	14,14 ± 0,64^{x} n=15 116%
M	16,14 ± 1,06 n= 9 100%	19,45 ± 1,00^{x} n=10 121%
PZ	19,74 ± 1,42 n= 5 100%	16,11 ± 1,42 n= 5 82%

Tb 41 Einfluß von Adrenalin auf die cGMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M und Ink-D: s. Tb 40; PZ: U-Fraktion 5%: M-Fraktion 17%: PZ-Fraktion 71%; S-P: cGMP: jeweils K ↔ Adr → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 2; - M-Fraktion: V: E = 1; - PZ-Fraktion: V: E = 1

F.8 Prostaglandine und Vorstufen

F.8.1 Einfluß von Prostaglandinen und Vorstufen auf das Zellgemisch

F.8.1.1 PGE_2

Unter PGE_2 war das zelluläre cAMP zu allen geprüften Zeiten und das zelluläre cGMP nach 5min, aber nicht nach 30min signifikant erhöht (Tb 42 und 43). Die Konzentrationsabhängigkeit der PGE_2-Wirkung wurde bereits in Abb 22 dargestellt.

Inkubations-Dauer min	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	PGE_2
		1µmol/l
5+	525 ± 12 n=4 100%	1402 ± 79**** n=5 267%
		100µmol/l
30++	777 ± 20 n=5 100%	3213 ± 462*** n=5 414%
40++	618 ± 45 n=4 100%	4283 ± 333**** n=5 694%

Tb 42 Einfluß von PGE_2 auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: + = SP + IBMX 1mmol/l; ++ = SP + IBMX 1mmol/l + DTT 1mmol/l;
PZ: + = 19%; ++ = 21%
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ PGE → s. Tb

Inkubations-Dauer min	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	PGE_2
		1µmol/l
5^+	6,11 ± 0,36 n=4 100%	10,13 ± 1,31* n=5 166%
		100µmol/l
30^{++}	13,41 ± 1,52 n=5 100%	15,37 ± 2,71 n=5 115%

Tb 43 Einfluß von PGE_2 auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M und PZ: s. Tb 42
S-P: G-t: cGMP: jeweils K ↔ PGE → s. Tb

F.8.1.2 $PGF_{2\alpha}$ und Arachidonsäure

Ein Einfluß von $PGF_{2\alpha}$ 1µmol/l und Arachidonsäure 1mmol/l auf die Konzentrationen der cyclischen Nukleotide in IZ war nicht nachweisbar (Tb 17).

F.8.2 Einfluß von PGE_2 auf einzelne Zellfraktionen

PGE_2 1µmol/l erhöhte den cAMP-Spiegel in allen und den cGMP-Spiegel in der U- und M-Fraktion signifikant (Tb 44). Die Stimulierbarkeit des cAMP-Gehaltes durch PGE_2 korrelierte negativ mit dem PZ-Gehalt der Zellpräparationen ($k = -0,95$; $p<0,05$).

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	PGE_2 1µmol/l
U	539 ± 31 n= 9 100%	2270 ± 85^{xxxx} n=10 421%
M	601 ± 21 n=10 100%	1607 ± 61^{xxxx} n= 9 267%
PZ	504 ± 37 n=12 100%	743 ± 40^{xxx} n=10 147%

Tb 44 Einfluß von PGE_2 auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 17%; PZ-Fraktion 68%; S-P: cAMP: jeweils X ↔ PGE → s. Tb; - U-Fraktion: G-t: - M-Fraktion: G-t: - PZ-Fraktion: V: E = 2

Zell-Fraktion	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	PGE_2 1µmol/l
U	12,22 ± 0,68 n=20 100%	14,54 ± 0,83^{x} n=15 119%
M	16,14 ± 0,60 n= 9 100%	21,82 ± 1,07^{xxx} n=10 135%
PZ	19,74 ± 3,33 n= 5 100%	13,45 ± 0,51 n= 4 68%

Tb 45 Einfluß von PGE_2 auf die cGMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes

Ink-M und Ink-D: s. Tb 44; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 17%; PZ-Fraktion 71%; S-P: cGMP: jeweils X ↔ PGE → s. Tb; - U-Fraktion: V: E = 2; - M-Fraktion: G-t: - PZ-Fraktion: G-t

F.9 Stoffe, die zur Bildung von NO führen können

Natriumnitroprussid 1mmol/l, Hydroxylamin 1mmol/l, Natriumazid 1mmol/l, Natriumnitrit 10mmol/l und Hydraziniumsulfat 1mmol/l erhöhten den cGMP-Gehalt der IZ in Gegenwart von IBMX 1mmol/l signifikant. Die drei letztgenannten Substanzen bewirkten auch eine nachweisbare Stimulation des zellulären cAMPs (Tb 46 und 47, Abb 32).

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen		
Kontrolle	618 ± 42	n=5	100%
Natriumazid	830 ± 22^{xx}	n=5	135%
Natriumnitrit	891 ± 14^{xxx}	n=5	144%
Hydraziniumsulfat	842 ± 18^{xx}	n=4	136%
L-Cystein	719 ± 16	n=5	116%
Ascorbinsäure	748 ± 31^{x}	n=4	121%
Wasserstoffperoxid	924 ± 39^{xxx}	n=5	150%

Tb 46 Einfluß verschiedener Substanzen auf den cAMP-Spiegel der IZ
Parallel-Versuch zu Abb 32. Ink-M, Ink-D, PZ und Substanz-Konzentrationen: s. dort; S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Tb

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
Kontrolle	1117 ± 45 n=10 100%	9,89 ± 2,27 n=10 100%
Hydroxylamin 1mmol/l	1169 ± 45 n=10 105%	27,34 ± 2,40^{xxxx} n=10 276%
Natriumnitroprussid 1mmol/l	1178 ± 49 n= 9 105%	20,14 ± 1,58^{xxx} n= 9 204%

Tb 47 Einfluß von Hydroxylamin und Natriumnitroprussid auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%; S-P: V: E = 2; cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Tb

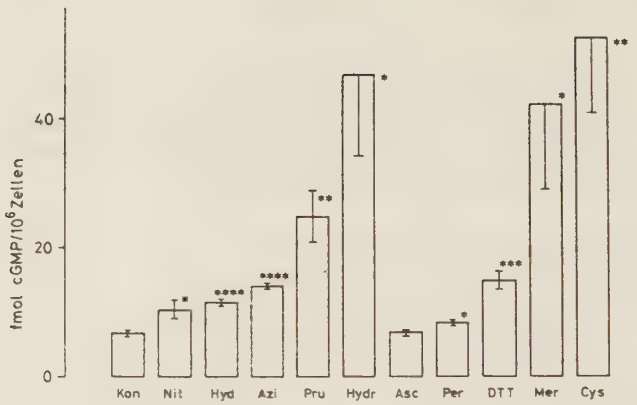


Abb 32 Einfluß verschiedener Substanzen auf den cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%; Kon: Kontrolle; Nit: Natriumnitrit 10mmol/l; Hyd: Hydraziniumsulfat 1mmol/l; Azi: Natriumazid 1mmol/l; Pru: Natriumnitroprussid 1mmol/l; Hydr: Hydroxylamin 1mmol/l; Asc: Ascorbinsäure 1mmol/l; Per: Wasserstoffperoxid 1mmol/l; DTT: Dithiothreitol 1mmol/l; Mer: 2-Mercaptoethanol 1mmol/l; Cys: L-Cystein 1mmol/l; Parallel-Versuch zu Tb 46
S-P: G-t: cGMP: jeweils X ↔ Testsubstanz → s. Abb (n=5)

Während Hydroxylamin 1mmol/l und Natriumnitroprussid 1mmol/l den cGMP-Spiegel auch in Abwesenheit von IBMX erhöhten, konnten die Thiole DTT 1mmol/l und 2-Mercaptoethanol 1mmol/l unter diesen Bedingungen keine Stimulation auslösen. Das zelluläre cAMP wurde dabei durch beide Substanzgruppen nicht nachweisbar beeinflußt (Abb 33).

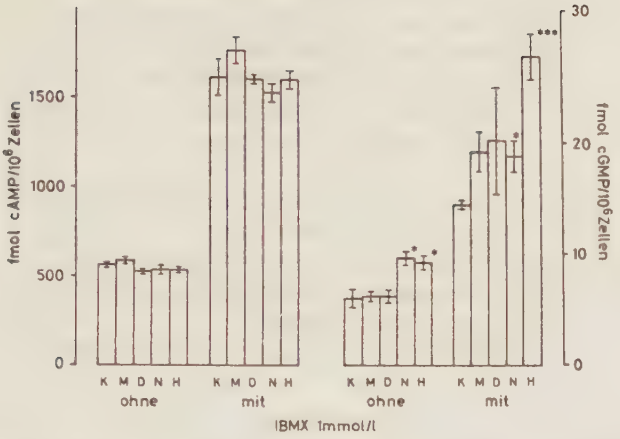


Abb 33 Einfluß von Thiolen und potentiellen NO-Bildnern auf die Spiegel der cyclischen Nukleotide in IZ bei Inkubation mit oder ohne IBMX

Ink-M: SP; Ink-D: 5min; PZ: 21%; K: Kontrolle; M: 2-Mercaptoethanol 1mmol/l; D: DTT 1mmol/l; N: Natriumnitroprussid 1mmol/l; H: Hydroxylamin 1mmol/l; Parallel-Versuch

S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Abb

links: cAMP-Spiegel

rechts: cGMP-Spiegel

F.10 Thiole und andere reduzierend oder oxidierend wirkende Substanzen

F.10.1 DTT

Bei Anwesenheit von IBMX 1mmol/l hatte DTT 100µmol/l keine (Abb 30 und Tb 28), DTT 1mmol/l aber eine ausgeprägte stimulierende Wirkung auf den cGMP-Spiegel (Tb 48). Demgegenüber war für DTT-Konzentrationen von 10µmol/l bis 10mmol/l kein Einfluß auf das zelluläre cAMP nachweisbar (Tb 48 und 49).Bezüglich der DTT-Wirkung in Abwesenheit von IBMX s. Abb 33

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
Kontrolle	971 ± 28 n=20 100%	10,26 ± 0,92 n=22 100%
DTT 1mmol/l	1029 ± 34 n=12 106%	17,23 ± 0,95**** n=20 167%

Tb 48 Einfluß von DTT auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%
S-P: jeweils K ↔ DTT → s. Tb; - V: E = 3; cAMP; - V: E = 4; cGMP

DTT-Konzentration	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen		
Kontrolle	674 ± 87	n=6	100%
10µmol/l	680 ± 39	n=6	101%
100µmol/l	610 ± 23	n=6	91%
1mmol/l	594 ± 19	n=5	88%
10mmol/l	664 ± 61	n=6	99%

Tb 49 Konzentrationsabhängigkeit der DTT-Wirkung auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 15min; PZ: 13%
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ DTT → alle n.s

F.10.2 L-Cystein und 2-Mercaptoethanol

In IZ erhöhte L-Cystein 1mmol/l den cGMP-Spiegel signifikant um 656%. 2-Mercaptoethanol 1mmol/l bewirkte eine signifikante Stimulation des zellulären cGMPs und cAMPs um 170 bzw 15% (Tb 46 und 50, Abb 32).

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
Kontrolle	1117 ± 50 n=10 100%	11,28 ± 4,55 n=10 100%
2-Mercaptoethanol 1mmol/l	1285 ± 50* n=10 115%	30,50 ± 4,55** n=10 270%

Tb 50 Einfluß von 2-Mercaptoethanol auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 19%
S-P: V: E = 2; cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Mer → s. Tb

F.10.3 Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid

Ascorbinsäure 1mmol/l erhöhte nur den cAMP-Spiegel der IZ signifikant um 21%. Wasserstoffperoxid 1mmol/l führte dagegen zu einer nachweisbaren Zunahme des zellulären cAMPs und cGMPs um 50 bzw 20% (Abb 32 und Tb 46).

F.11 Nicht-steroidale Antirheumatika

Indometacin 100µmol/l und Acetylsalicylsäure 100µmol/l hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Spiegel der cyclischen Nukleotide. Dagegen erhöhte Aminopyrin 100µmol/l das zelluläre cAMP signifikant um 16% (Tb 51).

F.12 Trijodthyronin und Calcitonin

Trijodthyronin 1µmol/l und Calcitonin 1µmol/l erhöhten das zelluläre cAMP signifikant um 47 bzw 19%, hatten aber keinen nachweisbaren Einfluß auf den cGMP-Spiegel der IZ (Tb 51). Bezüglich der Interaktion Trijodthyronin - Histamin s. Kap. F.4.2.1

Testsubstanz	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	cGMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen
Kontrolle	677 ± 19 n=10 100%	11,50 ± 0,97 n=7 100%
Indometacin 100µmol/l	745 ± 38 n= 5 110%	12,83 ± 0,56 n=5 112%
Acetylsalicylsäure 100µmol/l	730 ± 24 n= 5 108%	12,48 ± 0,64 n=5 109%
Aminopyrin 100µmol/l	786 ± 33^{xx} n= 5 116%	10,11 ± 0,42 n=5 88%
Trijodthyronin 1µmol/l	995 ± 99^{xxx} n= 5 147%	13,15 ± 0,23 n=5 114%
Calcitonin 1µmol/l	803 ± 27^{xx} n= 5 119%	13,27 ± 0,26 n=5 115%
Insulin 1mU/ml	703 ± 17 n= 4 104%	13,71 ± 0,66 n=5 119%
Glucagon 100nmol/l	730 ± 76 n= 5 108%	10,77 ± 0,59 n=4 94%
Somatostatin 1µmol/l	650 ± 19 n= 3 96%	11,49 ± 0,95 n=4 100%
Pankreozymin 1µmol/l	1038 ± 66^{xxxx} n= 5 153%	11,37 ± 0,58 n=5 99%
Serotonin 100µmol/l	755 ± 17 n= 5 111%	13,77 ± 0,54 n=5 120%

Fortsetzung Tb 51

Dopamin 100µmol/l	949 ± 44^{xxxx} n= 5 140%	12,08 ± 0,18 n=4 105%
Carbenoxolon 100µmol/l	699 ± 34 n= 5 103%	10,85 ± 0,81 n=5 94%
Proglumid 100µmol/l	702 ± 15 n= 5 104%	12,10 ± 1,17 n=4 105%
Hydrocortison 1µmol/l	852 ± 29^{xxx} n= 5 126%	14,90 ± 0,57^{x} n=5 130%
Relaxin 10nmol/l	766 ± 44^{x} n= 5 113%	17,68 ± 1,00^{xx} n=5 154%
Adrenochrom 10µmol/l	752 ± 37 n= 5 111%	13,82 ± 0,97 n=5 120%

Tb 51 Einfluß verschiedener Substanzen auf den cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 20%
S-P: G-t: cAMP und cGMP: jeweils K ↔ Testsubstanz → s. Tb

F.13 Pankreashormone

Insulin 1mU/ml und Glucagon 100nmol/l hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Spiegel der cyclischern Nukleotide in IZ (Tb 51). Bezüglich der Interaktion Glucagon - Histamin s. Kap F.4.2.1

F.14 Gastrointestinale Hormone

Somatostatin hatte in Konzentrationen von 1nmol/l bis 10µmol/l keinen Einfluß auf den cAMP-Spiegel der IZ (Abb 23). Auch das zelluläre cGMP wurde durch 1µmol/l nicht nachweisbar verändert (Tb 51). Pankreozymin 1µmol/l erhöhte den cAMP-Gehalt signifikant um 53%, blieb aber ebenfalls ohne Einfluß auf den cGMP-Spiegel (Tb 51). Bezüglich der Interaktion Somatostatin - Histamin s. Kap. F.4.1.1

F.15 Forskolin

F.15.1 Einfluß von Forskolin auf das Zellgemisch

Forskolin-Konzentrationen über 100nmol/l stimulierten den cAMP-Spiegel der IZ signifikant ($EC_{50} \approx 680$nmol/l). Die größte Wirkung wurde mit Forskolin 100µmol/l erzielt, das das zelluläre cAMP um 950% anhob (höhere Forskolin-Konzentrationen, die möglicherweise zu einer noch stärkeren Stimulation geführt hätten, konnten aufgrund des Lösungsverhaltens der Substanz nicht mehr geprüft werden) (Abb 34). Durch Forskolin 10µmol/l wurde der cAMP-Spiegel zu allen geprüften Zeiten signifikant erhöht, wobei eine annähernd maximale Stimulation bereits nach 2min erreicht wurde (Abb 34).

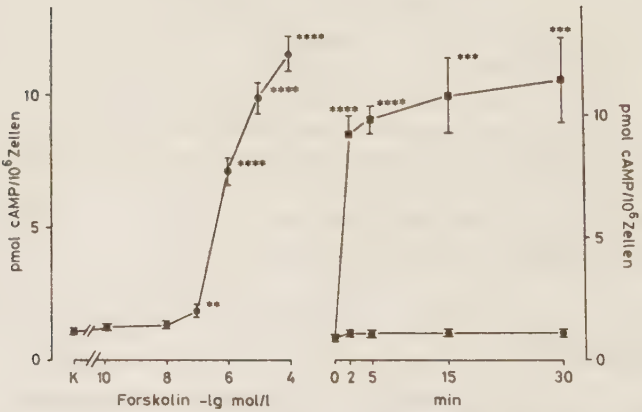


Abb 34 - links: Konzentrationsabhängigkeit der Forskolin-Wirkung auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: 21%
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ For → s. Abb (n=5)

rechts: Zeitabhängigkeit der Forskolin-Wirkung auf den cAMP-Spiegel der IZ
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; PZ: 21%; ●: Kontrolle; ■: Forskolin 10µmol/l
S-P: G-t: cAMP: jeweils K ↔ For → s. Abb (n=5)

F.15.2 Einfluß von Forskolin auf einzelne Zellfraktionen

Forskolin 10µmol/l erhöhte den cAMP-Spiegel in allen Zellfraktionen signifikant (Tb 52). Bezüglich der Interaktion Histamin - Forskolin in der PZ-Fraktion s. Kap F.4.2.1

Zell-Fraktion	cAMP-Spiegel fmol/10^6 Zellen	
	Kontrolle	Forskolin 10µmol/l
U	575 ± 27 n=14 100%	7428 ± 296$^{\#\#\#\#}$ n=14 1291%
M	1087 ± 59 n=15 100%	16112 ± 2562$^{\#\#\#\#}$ n=14 1482%
PZ	596 ± 510 n=13 100%	7386 ± 618$^{\#\#\#\#}$ n= 9 1239%

Tb 52 Einfluß von Forskolin auf die cAMP-Spiegel von Zellfraktionen unterschiedlichen PZ-Gehaltes
Ink-M: SP + IBMX 1mmol/l; Ink-D: 5min; PZ: U-Fraktion 5%; M-Fraktion 17%; PZ-Fraktion 70%
S-P: cAMP: jeweils K ↔ For → s. Tb; - U-Fraktion: G-t; - M-Fraktion: G-t; - PZ-Fraktion: V: E = 2

F.16 Ethanol

Ethanol hatte in Konzentrationen von 12mmol/l bis 1,2mol/l (0,07 - 7 Volumen-%) keinen nachweisbaren Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel der IZ (Abb 23), führte aber in einer Konzentration von 120mmol/l zu einer signifikanten Erhöhung des zellulären cGMPs um 63% (Tb 17). Bezüglich der Interaktion Ethanol - Histamin s. Kap. F.4.1.3

F.17 Andere Substanzen

Serotonin 100µmol/l, Relaxin 10nmol/l, Hydrocortison 1µmol/l und Dopamin 100µmol/l führten zu einer signifikanten Stimulation des cAMP-Spiegels der IZ um 11,13,20 und 40%. Keinen nachweisbaren Einfluß hatten Carbenoxolon 100µmol/l, Proglumid 100µmol/l und Adrenochrom 10µmol/l. Eine signifikante Erhöhung des zellulären cGMPs um 30 bzw 54% ergab sich nur durch Hydrocortison 1µmol/l und Relaxin 10nmol/l (Tb 51).

F.18 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Tb 53 bringt eine übersicht über die gemessenen Substanz-Wirkungen. Die in der Tb angegebenen Symbole bedeuten:
PDE: Phosphodiesterase; ASS: Acetylsalicylsäure; Spalte 1: 0 = kein signifikanter Einfluß, S = signifikante Stimulation, H = signifikante Hemmung; $^{-}$ = Wirkung von Zellvorbehandlung abhängig; Spalte 2: Substanz-Effekt in % der Kontrolle, in der Regel wurde der größte gemessene Effekt angegeben; Spalte 3: Lokalisation des Substanz-Effektes: U = U-Fraktion, M = M-Fraktion, P = PZ- Fraktion, A = alle Fraktionen, $^{+}$ = Substanz-Effekt korrelierte positiv mit dem PZ-Gehalt, $^{++}$ = Substanz-Effekt korrelierte negativ mit dem PZ-Gehalt; ^{1}: Substanz (= S) hemmte den Histamin-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{2}: S verstärkte den Histamin-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{3}: S hemmte den Histamin-Effekt auf den cGMP-Spiegel; ^{4}: S hemmte den Carbachol-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{5}: S hemmte den Carbachol-Effekt auf den cGMP-Spiegel; ^{6}: S hemmte den Adrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{7}: S verstärkte den Adrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{8}: S verstärkte den Adrenalin-Effekt auf den cGMP-Spiegel; ^{9}: S hemmte den Noradrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel; ^{10}: S vergrößerte den Noradrenalin-Effekt auf den cGMP-Spiegel; ^{11}: S beeinflußte den Histamin-Effekt auf den cAMP-Spiegel nicht signifikant; ^{12}: S beeinflußte den Histamin-Effekt auf den cGMP-Spiegel nicht signifikant; ^{13}: S beeinflußte den Adrenalin-Effekt auf den cGMP-Spiegel nicht signifikant; ^{14}: S beeinflußte den Carbachol-Effekt auf den cGMP-Spiegel nicht signifikant

Substanz	cAMP-Spiegel			cGMP-Spiegel		
	1	2	3	1	2	3
PDE-Hemmstoffe						
IBMX	S	124%		S	98%	
Theophyllin	S	60%		-		
Histamin	S	85%	M+P^{+}	S	77%	U
Antihistaminika						
Cimetidin[1 3]	O			O		
Mepyramin[11 12]	O			O		
Cholinergika						
Carbachol	S	17%		S	33%	U
Pilocarpin	S	15%		S	26%	
Acetylcholin	O	10%		O	20%	
Parasympatholytika						
Atropin[4]	O			-		
Pentagastrin	S	31%	M	O		
α-Sympathomimetika						
Noradrenalin	S	60%		S	16%	
Phenylephrin	S	59%		S	25%	
Naphazolin	O			O		
ß-Sympathomimetika						
Adrenalin[1]	S	181%	A^{++}	S	88%	U+M
Hexoprenalin	S	185%		S	60%	
Ind. Sympathomim.						
Ephedrin	O			S	52%	
Adr. Antagonisten						
Propranolol[6 8]	O			H	20%	
Phentolamin[9 10]	O			H	20%	
Prostaglandine						
PGE_2[1]	S	594%	A^{++}	S	66%	U+M
$PGF_{2\alpha}$	O			O		
Arachidonsäure	O			O		
NO-Bildner						
Nitroprussid	O			S	104%	
Hydroxylamin	O			S	176%	

Substanz	cAMP-Spiegel			cGMP-Spiegel		
Natriumazid	S	35%		S	103%	
Natriumnitrit	S	44%		S	50%	
Hydrazinium	S	36%		S	67%	
Thiole						
DTT[6 13 14]	O			S	67%	
L-Cystein	O			S	656%	
Mercaptoethanol	S	15%		S	170%	
Ascorbinsäure	S	21%		O		
Wasserstoffperoxid	S	50%		S	20%	
Antirheumatika						
Indometacin	O			O		
ASS	O			O		
Aminopyrin	S	16%		O		
Trijodthyronin[1]	S	47%		O		
Calcitonin	S	19%		O		
Pankreas-Hormone						
Insulin	O			O		
Glucagon[11]	O			O		
GI-Hormone						
Somatostatin[1]	O			O		
Pankreozymin	S	53%		O		
Forskolin[2]	S	950%		-		
Ethanol[1]	O			S	63%	
Serotonin	S	11%		O		
Relaxin	S	13%		S	54%	
Hydrocortison	S	20%		S	30%	
Dopamin[1]	S	40%		O		
Carbenoxolon	O			O		
Proglumid	O			O		
Adrenochrom	O			O		
Kationen						
Kalium	O			O		
Calcium[5 7 8]	O/S$^-$			H		
Magnesium	S	25%		-		
HEPES	S			-		

Tb 53 Zusammenfassung der gemessenen Substanz-Wirkungen

G Diskussion der radioimmunologischen Methodik

G.1 Antisera-Gewinnung

G.1.1 Präparation der Antigene

Die Präparation der Immunogene durch Koppelung der succinylierten Nukleotide an ein Trägerprotein erfolgte in dieser und in der Mehrzahl der bis jetzt veröffentlichten Arbeiten (50,57,58,91,262,269,292, 345,346,347,349,390) mittels der Carbodiimid-Methode [Reaktionsmechanismus s. (322)]. Als Alternative hierzu wurde die Verwendung von Ethylchloroformat (gemischte Anhydridmethode) vorgeschlagen (59).

Als Trägerproteine wurden neben dem in dieser Arbeit verwendeten HSA auch Poly-L-Lysin (346,347), Keyhole Limpet Haemocyanin (346,347, 390), Thyreoglobulin (262) und Ovalbumin (390) eingesetzt. Die erhaltene Bindung von durchschnittlich 4,8 Mol ScAMP bzw 12,1 Mol ScGMP pro Mol HSA stimmt gut mit den Literaturangaben überein [ScAMP: 8 - 12 (59), 4 (292), 5 - 6 (345,346,347), 6 (269), 3 - 12 (91), 3 - 7 (58); ScGMP: 8 - 12 (59), 3 - 12 (91), 7 (57); Angaben in Mol cyclisches Nukleotid pro Mol Albumin]. Die Koppelung an Poly-L-Lysin und Keyhole Limpet Haemocyanin lieferte dagegen höhere Bindungswerte [25 (346,347) bzw 60 (346,347) und 160 (390); Angaben in Mol cyclisches Nukleotid pro Mol Trägerprotein].

G.1.2 Prüfung der Antisera

Die cAMP- bzw cGMP-AS erreichten ein Maximum an Bindungsfähigkeit nach der zweiten bzw vierten Booster-Injektion, wobei aber große Unterschiede zwischen den einzelnen Kaninchen bestanden. Die als Maß für die Affinität der succinylierten cyclischen Nukleotide zu den Antikörpern berechneten Dissoziationskonstanten von $6{,}0\times10^{-11}$mol/l für das cAMP-AS H3 bzw $6{,}2\times10^{-11}$mol/l für das cGMP-AS T3 stimmten ebenso wie die Bindungsstellenkonzentrationen von $5{,}4\times10^{-6}$mol/l bzw $8{,}3\times10^{-7}$mol/l in den unverdünnten AS gut mit bereits veröffentlichten Werten überein.

Literatur: Dissoziationskonstanten (mol/l) für
ScAMP: 3,4 - 5×10^{-11} (59), 8×10^{-11} (269), $4{,}1 \times 10^{-10}$ (169), $4{,}6 \times 10^{-10}$ - 8×10^{-11} (56)
AcAMP: 5×10^{-11} (321)
cAMP: 5×10^{-10} (116,321), $1{,}2 \times 10^{-7}$ (169), $1{,}8 \times 10^{-8}$ - $9{,}2 \times 10^{-9}$ (56)
ScGMP: $1{,}2 \times 10^{-10}$ - 4×10^{-11} (57,59), $8{,}8 \times 10^{-10}$ (169), 1×10^{-9} - 4×10^{-11} (91)
cGMP: $1{,}8 \times 10^{-8}$ - 1×10^{-9} (390), $3{,}6 \times 10^{-7}$ (169)

Bindungsstellenkonzentration im unverdünnten Serum für
cGMP: $5{,}4 \times 10^{-7}$ (57); cAMP: $2{,}7 \times 10^{-6}$ (269)

Wie aufgrund der Struktur der Immunogene (Succinat-Brücke) nicht anders zu erwarten, sind die Dissoziationskonstanten für succinylierte cyclische Nukleotide dabei in der Regel kleiner als die der nativen Substanzen (s. oben). Von den hier verwendeten AS wurden succinyliertes cAMP und cGMP 1000 bzw 39mal besser gebunden als die unveränderten Substanzen. In anderen Arbeiten ergaben sich für die Verstärkung der Bindung durch Acylierung folgende Werte:
ScAMP ↔ cAMP: x40 - 380 (59,91), x100 (128,169,346)
AcAMP ↔ cAMP: x40 (154), x40 - 380 (59,91), x48 (262), x80 (349), x100 (128)
ScGMP ↔ cGMP: x33 - 450 (59,91), x40 (128), x50 (57), x200 (169)
AcGMP ↔ cGMP: x16 (262), x20 (128), x20 - 85 (59)

Succinyliertes cAMP wurde durch das cGMP-AS T3 10^4mal schlechter gebunden als succinyliertes cGMP. Da cAMP in den untersuchten Proben aber nur in rund 100fach höherer Konzentration als cGMP vorlag, konnte es den cGMP-RIA nicht stören. Umgekehrt konnte auch succinyliertes cGMP, daß in 300fach geringerem Maße als succinyliertes cAMP durch das cAMP-AS H3 gebunden wurde, den cAMP-RIA nicht beeinflussen. Kreuzreaktionen ganz ähnlichen Ausmasses wurden auch in folgenden Arbeiten gefunden: cAMP im cGMP-RIA (50,57,59,91,122,154,169,185, 262, 346,382,390,393); cGMP im cAMP-RIA (50,56,59,91,154,169,262,292,321, 346,347,349,382,383).

Andere succinylierte Nukleotide und Nukleoside wurden durch die geprüften AS in 10^5 bis mehr als 10^6fach geringerem Maße als die succinylierten cyclischen Nukleotide gebunden. Auch dies stimmt gut mit bereits veröffentlichten Werten über die Spezifität von cAMP- (50, 56,58,116,128,154,246,262,292,321,345,346,349,383) und cGMP-AS (50,

57,128,154,185,262,346,393) überein. Trotz vergleichbar guter Spezifität gegen diese störenden Nukleotide und Nukleoside ergaben sich bei Bestimmung von cAMP- und cGMP-Gewebespiegeln mit den verschiedenen AS zum Teil gravierende Unterschiede. So war der größte Messwert für die cGMP-AS ungefähr 12mal und für die cAMP-AS rund 2mal so groß wie der jeweils kleinste gemessene Wert. Dies deutet darauf hin, daß außer den geprüften Nukleotiden und Nukleosiden eventuell noch andere im RIA interferierende Substanzen in den Gewebeproben vorlagen. Der direkte Vergleich der AS durch Messung von Gewebespiegeln lieferte somit wichtige Hinweise über deren mögliche Verwendung im routinemäßigen Assay und sollte auf jeden Fall zusätzlich zu den anderen Spezifitätsprüfungen durchgeführt werden.

Kaliumsuccinat hatte keinen Einfluß auf die Bindung der rmH durch die AS H3 und T3. Dagegen wurde von anderen Autoren (57,59,91,154,393) berichtet, daß dieses, ebenso wie das bei der Acetylierung entstehende Acetat (59,91,349), zu einer Erniedrigung der Bindung im RIA führte, sodaß die acylierten Proben vor ihrer Bestimmung im RIA eventuell verdünnt werden mußten. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen AS war dagegen auch die Messung von unverdünnten succinylierten Proben möglich.

G.2 Präparation der radioaktiv markierten Haptene

Die Jodierung des ScAMP- bzw ScGMP-TME erfolgte in dieser und in den meisten anderen bis jetzt veröffentlichten Arbeiten (50,56,57,59,91, 154, 169,262,345,349,382) mittels der von Hunter und Greenwood (172) entwickelten Chloramin T Methode. Alternativ hierzu wurde die Verwendung von Lactoperoxidase vorgeschlagen (292).

Die Reinigung der Tracer erfolgte unter Verwendung einer Sephadex G-25 superfine Säule (56,57,59,91,349). Die gewünschten mono-^{125}J-ScAMP-TME und mono-^{125}J-ScGMP-TME wurden dabei in hoher Ausbeute (70 - 80% der Gesamt-Aktivität) und Immunoreaktivität (Bindung durch die entsprechenden AS >90%) gewonnen. Laut Angaben von Cailla et al (57) werden unter diesen Bedingungen auch die nicht markierten ScAMP- bzw ScGMP-TME abgetrennt, sodaß die spezifischen Aktivitäten der erhaltenen mono-jodierten Präparate gleich der des eingesetzten ^{125}Jod ($\approx$ 1,6 - 1,8x10^6 Curie/mol) sind. Zur Reinigung der Tracer wurden u.a. auch Sephadex G-10- (169,185,292,345,382) und QAE-Sephadex-Säulen

(262), Papierchromatographie [auf Whatman 31 ET Papier (50)], Dünnschichtchromatographie [auf Cellulose mit Nachreinigung über DEAE-Cellulose Säulen (154)] und Elektrophorese [auf Cellulose mit Nachreinigung über Dowex 50W-X8 Säulen (50)] eingesetzt. Bezüglich der diesen Trennungsmethoden zugrundeliegenden Prinzipien s. Kap G.4

Auch die Verwendung von Tritium-markiertem cAMP bzw cGMP als RIA-Tracer ist möglich (116,321,383,390). Diese haben allerdings den Nachteil einer wesentlich geringeren spezifischen Aktivität ($\approx$ 14 - 38x10^3 Curie/mol), und die Bestimmung der emittierten ß-Strahlung ist nur in einem Flüßigkeits-Szintillationszähler möglich, was einen größeren Arbeitsaufwand und eine geringere Zählausbeute mit sich bringt.

G.3 Extraktion der cyclischen Nukleotide

Die Extraktion der cyclischen Nukleotide mittels $HClO_4$ erfolgte in Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (58) schnell und quantitativ, während andere Nukleotide und Nukleoside anscheinend wesentlich langsamer extrahiert werden (11). Zur Bestimmung der cyclischen Nukleotide in IZ wurden unter anderem folgende Extraktionsmittel verwendet: $HClO_4$ (17,18,106,112,134,135,136), Trichloressigsäure (75,76,78,160,161,165,325,326,327,328,336,341,342,364,388), Salzsäure (215,271,299), Salzsäure/Methanol (266) und Ethanol (19 - 28). Der Vorteil der $HClO_4$ liegt vor allem in ihrer leichten Abtrennbarkeit durch Ausfällung als Kaliumperchlorat. Dagegen sind bei anderen Verfahren oft arbeitsaufwendige Extraktions- (Trichloressigsäure) oder Lyophilisationsschritte (Salzsäure) nötig um die Säuren zu entfernen.

G.4 Abtrennung störender Substanzen durch Aluminiumoxid

Al_2O_3 wurde verschiedentlich zur säulen- und dünnschichtchromatographischen Abtrennung störender Substanzen von den cyclischen Nukleotiden eingesetzt. Auch "Batch"-Verfahren wie in dieser Arbeit wurden von einigen Autoren angewandt, wobei jedoch keine Aussagen über quantitative Zusammenhänge zwischen verwendeter Al_2O_3-Menge und erhaltenem Messwert gemacht wurden, so daß es ratsam schien dies näher zu untersuchen. In der Literatur wurden folgende auf der Verwendung von

Al_2O_3 beruhende Verfahren angegeben:
1. Säulenchromatographie: Al_2O_3-Säulen (86,262,288,384,385); Kombination Al_2O_3- + Dowex AG 1-8 Säulen (8,87,115,181,197,198,199,264,302, 360); Kombination Al_2O_3- + Dowex AG 1-2 Säulen (271,276); Kombination Al_2O_3- + Dowex AG 50W-4 (bzw 8) Säulen (43,87,211,240,262,288,289, 386); Kombination Al_2O_3- + Dowex AG 1-2- + Dowex AG 50W-8 Säulen (221); Kombination Al_2O_3- + Dowex AG 1-2 + Sephadex G-10 Säulen (192,221); Kombination Al_2O_3-Säule + Zinkcarbonat-Fällung (133)
2. Dünnschichtchromatographie: Al_2O_3-Platten (126)
3. Batch-Verfahren: Al_2O_3-Substanz (280,303); Kombination Al_2O_3-Substanz + Dowex AG 50W-8 Säule (94)

Andere zur Abtrennung störender Substanzen eingesetzte Verfahren, die kein Al_2O_3 verwenden, sind nachstehend aufgeführt:
1. Säulenchromatographie: Dowex AG 1-8 Säulen (128,185,266,302); Dowex AG 50W-4 Säulen (75,76,78,160,161,165); Dowex AG 50W-8 Säulen (302,347); Dowex AG 50W-2 Säulen (171,246); Kombination Dowex AG 1-8- + Dowex AG 50W-8 Säulen (393); Kombination QAE-Sephadex- + SP-Sephadex Säulen (91)
2. Co-Präzipitation mit anorganischen Salzen (z.B. Bariumsulfat) (67, 147,171,238,254,391)

Die angegebenen Methoden beruhen auf folgenden Prinzipien (245,306): 1. Adsorption und Anionenaustausch (384): Al_2O_3; 2. Ionenaustausch: Anionenaustauscher - stark basisch (Dowex AG 1-8, Dowewx AG 1-2, QAE-Sephadex) - schwach basisch (DEAE-Cellulose); Kationenaustauscher - stark sauer (Dowex AG 50W-2, Dowex AG 50W-4, Dowex AG 50W-8, SP-Sephadex); 3. Gel (Molekularsieb)- Chromatographie: Sephadex G-10, Sephadex G-25

Vor der Zugabe des Al_2O_3 war es notwendig den Probenauszug zu neutralisieren, da die cyclischen Nukleotide im stärker sauren Bereich (pH<4) an Al_2O_3 adsorbiert werden und im stärker alkalischen Bereich (pH>8) die Elution störender Nukleotide zunimmt (384). Bei neutralem pH-Wert werden dagegen nur polyvalente Nukleotide stark adsorbiert und können so von den cyclischen Nukleotiden abgetrennt werden (384). In dieser Arbeit war die Recovery von cGMP nach Al_2O_3-Behandlung quantitativ und die Recovery von cAMP nahezu quantitativ (95%), während interferierende polyvalente Nukleotide zu mehr als 90% adsorbiert wurden. Die Anwesenheit von Hydrogencarbonat-Anionen im Medium, wie hier der Fall, scheint dabei die Recovery von cGMP zu erhöhen (384).

Zur Reinigung erwiesen sich 28 mg Al_2O_3 pro Probe als ausreichend, da größere Mengen zu keiner weiteren Reduzierung der cGMP-Messwerte und damit des Einflusses störender Substanzen führten. Da die Standardwerte in gleicher Weise wie die Proben behandelt wurden und die Einwaage des Al_2O_3 in dem hier verwendeten "Batch"-Verfahren sehr gut reproduzierbar war, konnte im Unterschied zur Säulenchromatographie auf eine Recovery-Korrektur verzichtet werden. Sie wäre auch bei den in IZ vorliegenden Konzentrationen der cyclischen Nukleotide mit Tritium-markierten Tracern kaum durchführbar, da die Tracermenge im Falle des cGMP die zu messende Menge um ein Vielfaches übersteigen würde.

Die Abtrennung störender Substanzen durch Co-Präzipitation mit Bariumsulfat führte zwar zu ähnlichen Ergebnissen wie das Al_2O_3-Verfahren, jedoch war die Bindung der rmH im RIA - eventuell durch Salzeffekte - erniedrigt. Da auch der Arbeitsaufwand größer als beim Al_2O_3-Verfahren war, wurde diesem der Vorzug gegeben.

G.5 Succinylierung

Die zur Erhöhung der Affinität der cyclischen Nukleotide zu den AS vorgenommene Succinylierung verlief, wie auch von anderen Autoren berichtet (58,169,393), quantitativ. Voraussetzung hierfür war jedoch, daß der pH-Wert der zu succinylierenden Proben vor Beginn der Reaktion stark alkalisch (pH>12) war, um eine Aktivierung der 2'-OH Gruppe der cyclischen Nukleotide zu gewährleisten (58). Nach Beendigung der Succinylierung sollte der pH-Wert der Lösung dagegen leicht sauer sein, da im alkalischen Milieu eine schnelle Hydrolyse der gebildeten Succinat-Ester eintritt (60).

Alternativ zu der hier verwendeten Methode nach Delaage et al (59,91) mit KOH und lyophilisiertem BA wurden folgende Succinylierungsgemische vorgeschlagen: BA in Aceton und Triethylamin (8,128); BA in Dioxan und Triethylamin (169,372); BA in Tetrahydrofuran und Triethylamin (393); BA Festsubstanz und Triethylamin (57,58). Ein Nachteil dieser Verfahren ist, daß Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran und Triethylamin-Succinat die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen und zu einer Erniedrigung der Bindung der rmH im RIA führen können (91), während Kaliumsuccinat in dieser Hinsicht keine (diese Arbeit) oder nur geringe (91) Wirkung aufweist. Da BA unter den verwendeten

Lyophilisationsbedingungen flüchtig war, sollte eine geeignete Lyophilisationsdauer für das jeweils benutzte Gefriertrocknungssystem neu ermittelt werden.

Anstelle der Succinylierung kann auch eine Acetylierung der Proben vorgenommen werden, wozu Kombinationen von Acetanhydrid und KOH (59) bzw Acetanhydrid und Triethylamin (50,52,115,122,128,145,154,211, 262,321,349) eingesetzt wurden. Allerdings scheint die Affinität einiger cGMP-AS für die succinylierten Derivate größer als für die acetylierten Derivate zu sein (91).

Im Gegensatz zu der von Cailla et al (58) eingeführten, schnell [in Minuten (91)] und vollständig erfolgenden Acylierung der cyclischen Nukleotide in wäßrigem Medium, verlief die ursprünglich angewandte Präparation in organischem Medium langsamer und mit geringerer Ausbeute (60,114,247,248).

G.6 RIA-Puffer

Beim Vergleich verschiedener Medien erwies sich Citrat-Puffer 100mmol/l pH6,2 aufgrund der höheren erzielten Bindung im RIA günstiger als Acetat-Puffer 50mmol/l pH6,2. Von anderen Autoren wurden zur Bestimmung cyclischer Nukleotide unter anderem folgende RIA-Puffer angewandt:

Acetat-Puffer: pH4,75 (50,51,52,146,154); pH6,0 (8,122,383); pH6,2 (56,115,128,185,262,292,321,345,346,348,382,393); pH6,3 (211)

Citrat-Puffer: pH6,1 (349); pH6,2 (57,58,59,91)

Imidazol-Puffer: pH6,5 (169); pH7,0 (346); pH7,4 (372)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (Tris): pH7,5 (390)

Tris-Maleat-Puffer: (246)

N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure-Puffer (TES): pH7,4 (262)

Natriumborat-Puffer: pH8,9 (116)

Cacodylat-Puffer: pH6,2 (246)

C.7 Trennung von freier und gebundener Aktivität

Die Trennung von freier und gebundener Aktivität durch Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung von Membranen aus regenerierter Cellulose (56,57,58,59,91) erwies sich als saubere und präzise (s. Kap C.4) Methode, die bei den vorhandenen Geräten (Schüttler für 40 Dialyseblöcke, 10 Dialysekammern pro Block) die simultane Bestimmung von 400 Probenwerten ermöglichte. Zur Trennung von freier und gebundener Aktivität wurden daneben auch folgende Verfahren eingesetzt:

1. Doppelantikörper-Methode (56,115,122,345,346,383,393)
2. Filtration durch Millipor-Filter (8,383)
3. Elektrophorese in Agar (56)
4. Adsorption der freien Aktivität an Aktivkohle (50,146,154), Dextran-beschichtete Aktivkohle (116,169,237,372), Dowex AG 1-8 Säulen (52) oder Dowex AG 1-8- + Aktivkohle Säulen (51)
5. Ausfällung der gebundenen Aktivität mit Ethanol (128,262), Polyethylenglycol (262,292,349), Ammoniumsulfat (321,380,382,390), Zirkonylphosphat-Gel (348) oder Antikörper-beschichteten Staphylococcus Aureus-Partikeln (349)

Vorteile der Dialyse-Methode waren u.a. die einfache Durchführbarkeit (Proben-Inkubation und Trennung von freier und gebundener Aktivität erfolgten in einem Schritt, ohne zusätzliche Maßnahmen wie z.B. Zentrifugation oder Ausfällung) und die geringe Gefahr einer Arbeitsplatzkontamination.

Das Maximum der Hapten-Antikörper-Reaktion wurde, in guter Übereinstimmung mit den für andere Methoden gefundenen Werten (169,237,346), nach 24h Inkubation erreicht.

C.8 Überprüfung der im cAMP- und cGMP-Assay erhaltenen Messwerte - Qualitätskontrolle

Die lineare Korrelation zwischen verwendeter Zellzahl und Gehalt an cyclischen Nukleotiden, die vollständige Recovery exogenen cAMPs und cGMPs, die Resultate der Phosphodiesterase-Versuche und die Vergleiche mit Literaturdaten belegen die Zuverlässigkeit der Messwerte. Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle dokumentieren darüber hinaus die Konstanz des Messystems über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren.

H Diskussion der pharmakologischen Beeinflussung der cAMP- und cGMP-Spiegel isolierter Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte

H.1 Einleitung

Falls überhaupt hormonelle Wirkungen im Magenkorpus durch cAMP oder cGMP als "second messenger" vermittelt werden, sollte, entsprechend den von Sutherland (352) aufgestellten Kriterien, der Zusatz exogener cyclischer Nukleotide diese Hormon-Effekte imitieren können. In der Tat sprechen die mit exogenem cAMP bzw seinen Derivaten Dibutyryl-cAMP und 8-Brom-cAMP erhaltenen Befunde für eine Beteiligung dieses Transmitters an bestimmten physiologischen Leistungen des Magenkorpus, wie z.B. der Säure-, Pepsinogen- und Intrinsic-Faktor-Sekretion. Die Frage nach einer möglichen Transmitter-Funktion des cGMP läßt sich dagegen aufgrund dieser Daten noch nicht eindeutig beantworten (Literatur s. Kapitelende). Ziel der nachfolgenden Diskussion ist es, die eigenen Daten mit Literaturangaben zu vergleichen und, wo dies möglich erscheint, Korrelationen zu physiologischen und pharmakologischen Wirkungen der untersuchten Substanzen herzustellen, um so weitere Hinweise auf mögliche Transmitter-Funktionen der cyclischen Nukleotide geben zu können.

Literatur: Wirkungen exogener cyclischer Nukleotide in der Magenschleimhaut

Erläuterung: Mit "in vitro" werden in dieser Arbeit alle Versuche bezeichnet, die nicht am lebenden Tier ("in vivo") durchgeführt wurden. Experimente mit IZ bzw ID werden dabei separat aufgeführt.

Alkali-Produktion: cAMP - kein Einfluß → Frosch: in vitro (123); cGMP - Stimulation → Frosch: in vitro (123)

Carboanhydrase: cAMP - Stimulation → Ratte: in vivo (234,287)

Chlorid-Transport: cAMP - kein Einfluß → Kaninchen: IZ (143)

Cytoprotection: cAMP - Stimulation → Kaninchen: Zellkultur (224)

Gastrin-Freisetzung: cAMP - Stimulation → Ratte: in vitro (156,193); cGMP - Stimulation → Ratte: in vitro (193)

Gastrin-Rezeptoren: DbcGMP - Hemmung der Gastrin-Bindung → Hund: IZ (283)

Histamin-Freisetzung: cAMP - kein Einfluß → Ratte: in vitro (212)

Intrinsic-Faktor-Sekretion: cAMP - Stimulation → Kaninchen: IZ (23), in vitro (181); Mensch: IZ (297,298); Meer-S: IZ (23); Ratte: IZ (296,298); cGMP - kein Einfluß → Kaninchen: in vitro (181)

Kalium-Aufnahme: cAMP und cGMP - Stimulation der basalen und Verstärkung der cholinergen Aufnahme → Meer-S: IZ (29)

Lactat-Dehydrogenase Freisetzung: cAMP - Stimulation → Kaninchen: ID (36)

Morphologie: cAMP - Veränderung → Kaninchen: ID (36)

Pepsinogen-Sekretion: cAMP - Stimulation → Kaninchen: ID (161,187); cGMP - kein Einfluß auf basale und cholinerge Sekretion → Kaninchen: ID (184) - Hemmung der cholecystokininergen Sekretion → Kaninchen: ID (164,184)

Protein-Kinase: cAMP - Stimulation → Meer-S: IZ (218,219)

Säureproduktion: cAMP - Stimulation der basalen Sekretion → Hund: IZ (326,328,334); Kaninchen: ID (35,36,75,79,119,120,121,174,284,381); Meer-S: IZ (21,22,307,308); Mensch: ID (118,119,120,151); Ratte: IZ (92,107,266,267,268,341), in vitro (49,213), in vivo (252,287); - Potenzierung der cholinergen Stimulation → Hund: IZ (333); Meer-S: IZ (22); Ratte: IZ (92,107,266,268) - Potenzierung der gastrinergen Stimulation → Hund: IZ (326,328,333); Kaninchen: ID (40); cGMP - basal, kein Einfluß → Hund: IZ (334); Kaninchen: ID (164); Maus: in vitro (90); Meer-S: IZ (22), in vitro (239) - basal, Stimulation → Frosch: in vitro (123); Ratte: in vitro (49); - kein Einfluß auf histaminerge Sekretion → Hund: IZ (283); Maus: in vitro (90); Meer-S: IZ (22) - kein Einfluß auf cholinerge Sekretion → Hund: IZ (283); Maus: in vitro (90) - Hemmung der gastrinergen Sekretion → Hund: IZ (283,340) - Verstärkung der gastrinergen Sekretion → Kaninchen: ID (164); Maus: in vitro (90) - Aufhebung der Cholecystokinin-bedingten Hemmung der gastrinergen Sekretion → Maus: in vitro (90)

Sauerstoffverbrauch: cAMP - basal, Stimulation → Frosch: IZ (225); Hund: IZ (325); Kaninchen: ID (36,37,39,164) - Potenzierung der cholinergen Stimulation → Kaninchen: ID (38,39); cGMP - basal, kein Einfluß → Hund: IZ (325)

Somatostatin-Freisetzung: cAMP - Stimulation → Ratte: in vitro (14)

H.2 Extrazelluläres cAMP und cGMP

Der gemessene extrazelluläre cAMP-Anteil stimmt mit Werten für IZ aus der Hunde- (388) und Meerschweinchenmagenschleimhaut (19) gut überein. Abweichend davon wurde in ID aus der Schleimhaut des Kaninchens (75) kein cAMP-Efflux gemessen. Ursache dieses Unterschiedes könnten vielleicht die zur Präparation der IZ notwendigen "schärferen" enzymatischen Inkubationsbedingungen und daraus resultierende Zellschädigungen sein.

Bezüglich des extrazellulären cGMP-Spiegels liegen bis jetzt keine Vergleichswerte vor. Die eigenen Daten zeigen aber, daß das gemessene cGMP zum überwiegenden Teil intrazellulär lokalisiert ist und das Stimulation, z.B. mit DTT, zu keiner signifikanten Erhöhung des extrazellulären Anteils führt.

H.3 Phosphodiesterase-Hemmstoffe

IBMX bewirkte eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung der cyclischen Nukleotidspiegel. Seine Wirkung auf den cAMP-Spiegel war dabei potenter und effizienter und das Maximum der Stimulation wurde schneller erreicht. Eine Stimulation durch Phosphodiesterase-Hemmstoffe wie z.B. IBMX, Theophyllin, RO 76398, ICI 63197, RO 201724 und Papaverin wurde für verschiedene Species beschrieben (Literatur s. Kapitelende). Wirkungsmechanismus dürfte dabei eine Hemmung der cAMP- (2,4,186,256,257,350) und cGMP-Phosphodiesterasen (2,4) der Magenzellen sein. Die im Vergleich zu IBMX schwächere Wirkung von Theophyllin erklärt sich aus der Tatsache, daß IBMX ein potenterer Hemmstoff dieser cAMP-Phosphodiesterasen ist (186). IBMX-Wirkungen, die mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in Verbindung gebracht werden, sind eine Stimulation der Säure- und Intrinsic-Faktor-Sekretion und des Sauerstoffverbrauchs der Magenzellen.

Literatur: Wirkungen von Phosphodiesterase-Hemmstoffen in der Korpus-Magenschleimhaut

cAMP-Spiegel: - Stimulation → Frosch: in vitro (76); Hund: IZ (215, 325), in vivo (220); Kaninchen: IZ (23), ID (77,197), in vitro (181); Meer-S: IZ (19,20,21,22), in vitro (249), in vivo (249); Ratte: IZ (272,342), ID (134,135), in vitro (253), in vivo (234,253,271); Schwein: in vitro (282)

cGMP-Spiegel: - Stimulation → Hund: in vivo (198); Kaninchen: ID (197); Meer-S: in vitro (61,62); Ratte: in vivo (271)

Intrinsic-Faktor-Sekretion: - Stimulation → Kaninchen: IZ (23), in vitro (181); Meer-S: IZ (23)

Säureproduktion: - Stimulation → Hund: IZ (325,326,332,333,334); Kaninchen: ID (35,77,78,174,197); Mensch: ID (151); Schwein: in vitro (282) - keine Stimulation → Ratte: IZ (92,266,267)

Sauerstoffverbrauch: - Stimulation → Hund: IZ (325,332) - keine Stimulation → Kaninchen: ID (78)

H.4 Histamin

Das biogene Amin Histamin ist in vivo (179) und in vitro (Literatur s. Kapitelende) ein starkes Stimulans der Magensäureproduktion und scheint auch an der physiologischen Regulation dieser Funktion beteiligt zu sein.

Es bewirkte eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in einer Größenordnung, die mit anderen für isolierte Rattenzellen veröffentlichten Werten übereinstimmt (266,341,342). Dagegen war sein Effekt in isolierten Rattenmagendrüsen ungefähr 10mal größer (134,135). Ursache dafür könnte die zur Präparation der IZ notwendige zusätzliche Pronase-Behandlung sein (134). Eine stimulierende Histamin-Wirkung wurde auch in isolierten Präparationen anderer Species gefunden. Der zugrundeliegende Mechanismus besteht in der Aktivierung einer AC, während die cAMP-Phosphodiesterasen nicht beeinflußt werden (Literatur s. Kapitelende). Im Gegensatz zu den eindeutigen Ergebnissen in IZ bzw ID liegen uber in vitro und in vivo Wirkungen von Histamin auf das cAMP-

System intakter Mukosa widersprüchliche Beobachtungen vor [übersicht bei (175,369)]. Die gemessene Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Histamin korrelierte mit dem PZ-Gehalt der Zellpräparationen. Dies bestätigt bereits bekannte Ergebnisse für IZ von Ratten (272,293,342), Hunden (215,388) und Kaninchen (187) und zeigt, daß die Histamin-aktivierte AC in den PZ lokalisiert ist. Auf mögliche Species-Unterschiede deutet aber die Stimulation des cAMP-Spiegels durch Histamin in PZ-freien Antrumdrüsen des Meerschweinchens hin (136,137), die sich bei Mensch (106) und Ratte (134,135) nicht bestätigen ließ.

Histamin bewirkte auch eine kurzfristige Erhöhung des cGMP-Spiegels, die jedoch in Nicht-PZ-Fraktionen lokalisiert war. Obwohl eine Stimulation des cGMP-Spiegels durch Histamin auch schon in anderen Geweben (z.B Darmmuskulatur, Cerebrum) gefunden wurde (145,227), konnte in der Mehrzahl der bis jetzt veröffentlichten Arbeiten ein solcher Histamin-Effekt in der Magenschleimhaut nicht beobachtet werden (Literatur s. Kapitelende). Ursache dafür könnten z.B. Speciesunterschiede, differierende Präparationen (in vivo, in vitro, IZ), abweichende Inkubationszeiten oder eine nicht ausreichende Empfindlichkeit der verwendeten Messysteme sein. Die fehlende Wirkung auf die GC im Magenschleimhauthomogenat ließe sich damit erklären, daß Histamin, wie auch viele andere Substanzen (z.B. Cholinergika), nur in intakten IZ in der Lage ist über einen indirekten Mechanismus (z.B. Calcium, Phospholipase) das cGMP-System zu aktivieren (s. Kap A).

Histamin-Wirkungen, für die Korrelationen zur Stimulation des cAMP-Spiegels nachgewiesen wurden (77,78,92,341), sind eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme, der Säureproduktion und der Intrinsic-Faktor-Sekretion isolierter Zellpräparationen. Ob der Stimulation des cGMP-Spiegels durch Histamin eine physiologische Bedeutung zukommt läßt sich dagegen zur Zeit noch nicht entscheiden. Eine Beteiligung dieses cyclischen Nukleotids an der Regulation der histaminergen Salzsäureproduktion erscheint jedoch aufgrund der Lokalisation des Effektes in Nicht-PZ als unwahrscheinlich.

Literatur: Histamin-Wirkungen in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - Stimulation → Kaninchen: IZ (75,77,78,161,165,187); Meer-S: IZ (137,152,202); Mensch: IZ (112); Ratte: IZ (272,293) - Stimulation nur mit Guanyl-imidodiphosphat → Ratte: IZ (31,266,365)

cAMP-Phosphodiesterase: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (256,257); Hund: in vitro (370); Meer-S: in vitro (243,389)

cAMP-Spiegel: - Stimulation → Hund: IZ (299,325,326,327,329,388); Kaninchen: IZ (23), ID (75,78,160,165,197); Meer-S: IZ (19,20,21,22, 24,25,26,27,28), ID (137); Mensch: IZ (112), ID (106,138); Ratte: IZ (266,341,342), ID (134,135)

cGMP-Spiegel: - Stimulation → Hund: in vivo (370) - keine Stimulation → Hund: in vivo (73,198,360,371); Kaninchen: ID (197), in vitro (181); Meer-S: in vitro (239); Mensch: in vivo (200,360); Ratte: in vivo (273)

cGMP im Magensaft: - Stimulation → Hund: in vivo (198)

GC: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (10); Hund: in vitro (370); Kaninchen: in vitro (351); Meer-S: in vitro (149)

Intrinsic-Faktor-Sekretion: - Stimulation → Kaninchen: IZ (23); Meer-S: IZ (23,259); Mensch: IZ (297); - kein Einfluß → Ratte: IZ (296,298)

Säureproduktion: - Stimulation → Hund: IZ (319,325,326,327,328,332, 333,334,394), ID (329); Kaninchen: IZ (79,336), ID (35,36,37,38,75, 78,79,119,120,163,174,187,197,284,381); Meer-S: IZ (20,21,22,24,307, 308); Mensch: ID (118,119,151); Ratte: IZ (92,266,267,272,293,341)

Sauerstoffaufnahme: - Stimulation → Hund: IZ (325,332,335,337,338); Kaninchen: ID (36,37,38,39,75,78,121,160,162,165,187); Ratte: IZ (259)

H.4.1 Interaktion Histamin - Antihistaminika

Antihistaminika führen in isolierten Zellpräparationen zu einer Hemmung der histaminergen Säureproduktion (Literatur s. Kapitelende). In vivo läßt sich dieser Effekt (unter anderem auch aufgrund der zu erreichenden tolerablen Blutspiegel) nur für H_2-Antihistaminika nachweisen (16) und zur Therapie der Ulkuskrankheit nutzen (98).

Der Histamin H_1-Antagonist Mepyramin und der H_2-Antagonist Cimetidin hatten in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten keinen Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel der IZ (Literatur s. Kapitelende). Da auch das zelluläre cGMP nicht beeinflußt wurde, scheinen die basalen Spiegel der cyclischen Nukleotide in dieser isolierten Präparation nicht unter permanenter histaminerger Kontrolle zu stehen.

Die Hemmung des Histamin-Effektes auf den cAMP-Spiegel durch Cimetidin steht im Einklang mit dem Konzept, daß die histaminerge Stimulation der PZ durch H_2-Rezeptoren [Definition s. (44)] vermittelt wird. Dem widerspricht auch die durch höhere Mepyramin-Konzentrationen bewirkte Hemmung nicht. Eine spezifische Blockade von H_1-Rezeptoren durch H_1-Antihistaminika findet nämlich schon bei 10^4mal geringeren Konzentrationen statt (331). Das H_1-Antagonisten in höherer Konzentration keine ausgeprägte selektive Wirkung aufweisen, zeigt sich z.B. an der durch sie hervorgerufenen Hemmung Natriumfluorid-, cholinerg- und Dibutyryl-cAMP vermittelter Effekte (6,92,107). Die Hemmung des Histamin-Effektes durch H_2-Antihistaminika kommt wahrscheinlich durch kompetitive Interaktion an den Histamin-Rezeptoren der Magenzellen zustande (21,22,24,27,202).

Auch für den Histamin-bedingten Anstieg des cGMP-Spiegels war Cimetidin ein wesentlich effizienterer Hemmstoff als Mepyramin. Dies deutet darauf hin , daß auch diese Histamin-Wirkung über H_2-Rezeptoren vermittelt wird, die jedoch aufgrund der mit den Zellfraktionen erhaltenen Ergebnisse auf Nicht-PZ lokalisiert sein müßten.

Literatur: Wirkungen von Antihistaminika in der Korpus-Magenschleimhaut

H_1-Antihistaminika:

AC: - basal, kein Einfluß → Ratte: IZ (31)

cAMP-Spiegel: - basal, kein Einfluß → Meer-S: IZ (19,28) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Meer-S: IZ (19,136), ID (137); Mensch: IZ (112); Ratte: IZ (342) - keine Hemmung der Histamin-Wirkung → Hund: IZ (299)

Säureproduktion: - Hemmung der Histamin-Wirkung durch Mepyramin → Hund: IZ (334); Kaninchen: ID (77,78); Ratte: IZ (92)

H_2-Antihistaminika:

AC: - basal, kein Einfluß → Ratte: IZ (31,266)

cAMP-Spiegel: - basal, kein Einfluß → Hund: IZ (299); Kaninchen: ID (187); Meer-S: IZ (19,26); Ratte: ID (135) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Hund: IZ (215,299,325); Kaninchen: ID (75,78,187); Meer-S: IZ (19,26,27,28,136); Mensch: IZ (112); Ratte: IZ (342), ID (135, 139)

GC: - basal, kein Einfluß → Ratte: in vitro (375)

Säureproduktion: - Hemmung der Histamin-Wirkung durch Cimetidin → Hund: IZ (334); Kaninchen: ID (77,78,120,121); Meer-S: IZ (328); Mensch: ID (119); Ratte: IZ (92,341)

H.4.2 Interaktion Histamin - Somatostatin

Das auch in den D-Zellen der Magenmukosa nachgewiesene (166) Tetradecapeptid Somatostatin führte in vivo (190) und in vitro (Literatur s. Kapitelende) zu einer Hemmung der histaminergen Säureproduktion, wobei Speciesunterschiede aber nicht auszuschließen sind. Daneben inhibiert es auch die Sekretion von Somatotropin und verschiedenen anderen Hormonen (231) und findet therapeutische Verwendung u.a. in der Therapie blutender Magenulcera (223).

Wie schon für andere Präparationen berichtet (Literatur s. Kapitelende), hatte Somatostatin auch in isolierten Rattenzellen keinen Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel. Es führte aber zu einer [vermutlich nicht-kompetitiven (21,135)] Hemmung des Histamin-Effektes. Die fehlende Wirkung auf den basalen cAMP-Spiegel steht im Widerspruch zu Berichten über die Stimulation einer wahrscheinlich in Nicht-PZ (293) lokalisierten AC. Für diese Diskrepanz gibt es im Moment noch keine Erklärung. Ohne die Bindung von Histamin an dessen Rezeptoren zu beeinflussen (21), inhibierte Somatostatin auch eine Histamin-stimulierte cAMP-abhängige Proteinkinase in isolierten Meerschweinchenmagenzellen (219), wobei die Funktion der im Magenkorpus gefundenen

spezifischen Somatostatin-Rezeptoren aber noch unklar ist (260,261). Im Zusammenhang mit der säuresekretionshemmenden Wirkung bildet die Inhibition des Histamin-Effektes auf den cAMP-Spiegel durch Somatostatin ein weiteres Indiz für eine Transmitter-Funktion des cAMP in der histaminergen Säureproduktion.

Literatur: Somatostatin-Wirkungen in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - basal, Stimulation → Mensch: in vitro (33,34); Ratte: IZ (293) - basal, keine Stimulation → Ratte: ID (140) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Mensch: in vitro (34); Ratte: IZ (293)

cAMP-Spiegel: - basal, kein Einfluß; Hemmung der Histamin-Wirkung → Meer-S: IZ (21), ID (137); Ratte: ID (135)

Säureproduktion: - Hemmung der Histamin-Wirkung → Kaninchen: IZ (79), ID (79); Meer-S: IZ [(21), konzentrationsabhängig aber auch Stimulation]; Ratte: IZ (293,294) - keine Hemmung der Histamin-Wirkung → Hund: IZ (242)

H.4.3 Interaktion Histamin - PGE_2

PGE_2, ein Prostaglandinderivat das auch von IZ der Magenschleimhaut synthetisiert wird (197,320), hatte keinen Einfluß auf die basale Säureproduktion isolierter PZ, hemmte aber den mit Phosphodiesterase-Hemmstoffen und Histamin ausgelösten Sekretionsprozeß (Literatur s. Kapitelende). In vivo wurde für PGE_2 u.a. eine Hemmung der basalen und stimulierten (Histamin, Gastrin, Cholinergika) Säureproduktion (16,263), eine Hemmung der ulcerogenen Aktivität verschiedenster Substanzen (263), eine Stimulation der Alkali- (124,132) und Schleimsekretion (1,176) sowie eine Förderung der Mukosa-Durchblutung (214) nachgewiesen.

Wie schon in isolierten Präparationen anderer Species gefunden (Literatur s. Kapitelende), führte PGE_2 auch in den isolierten Rattenmagenzellen zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des basalen und einer Hemmung des Histamin-stimulierten cAMP-Spiegels, wobei seine Potenz bezüglich der Hemmung des Histamin-Effektes wesentlich größer war. Für diese Wirkungen müssen unterschiedliche Angriffs-

punkte angenommen werden, da die PGE_2-Stimulation des cAMP-Spiegels in Nicht-PZ, die Hemmung des Histamin-Effektes aber in PZ zustande kam. Der Mechanismus dieser Hemmung ist noch nicht bekannt, scheint aber nicht in einer Beeinflussung der Histamin-Bindung an die H_2-Rezeptoren zu liegen (24).

Die erhaltenen Daten zeigen auch eine kurzfristige Stimulation des cGMP-Spiegels durch PGE_2, ein Befund, der von der Mehrzahl der anderen Autoren noch nicht erhoben werden konnte (Literatur s. Kapitelende). Eine wahrscheinliche Erklärung dieser Diskrepanz muß darin gesehen werden, daß der Effekt zeitlich begrenzt und nur geringfügig ausgeprägt war, so daß die signifikanten Veränderungen des cGMP-Spiegels nur durch engmaschige Bestimmungen erfaßt werden konnten.

Die Hemmung des Histamin-stimulierten cAMP-Spiegels und der histaminergen Säureproduktion durch PGE_2 belegen wiederum (s. auch Kap H.4.1 und H.4.2) die Bedeutung des cAMP für die Histamin-Wirkung auf die PZ. Ob der Stimulation des cAMP- und cGMP-Spiegels durch PGE_2 eine physiologische Bedeutung zukommt und welche Rolle dabei die im Magenkorpus entdeckten Prostaglandin-Bindungsstellen (363) spielen, ist im Moment noch unklar. Dies hängt auch damit zusammen, daß das Spektrum der Prostaglandinwirkungen in der Magenschleimhaut noch nicht eindeutig definiert ist. Als hypothetische Möglichkeit wäre eine Beteiligung der cyclischen Nukleotide an der "cytoprotectiven" bzw die Alkali- und Schleimsekretion stimulierenden Wirkung der Prostaglandine denkbar.

Literatur: PGE_2-Wirkungen in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - basal, Stimulation → Hund: in vitro (101,103,104,362); Meer-S: in vitro (99,102,389); Mensch: in vitro (33,34,316,317,318); Ratte: IZ (293,365), in vitro (366,367); Schwein: in vitro (363) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Ratte: IZ (293)

cAMP-Phosphodiesterase: - kein Einfluß → Hund: in vitro (362)

cAMP-Spiegel: - basal, Stimulation → Hund: IZ (326,388), in vitro (100); Kaninchen: ID (197); Meer-S: ID (137) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Hund: IZ (215,326,329); Kaninchen: ID (197); Meer-S: ID (137)

cGMP-Spiegel: - kein Einfluß → Hund: in vivo (199,371); Kaninchen: ID (197) - Stimulation → Ratte: in vivo (309)

GC: - kein Einfluß → Hund: in vitro (370); Meer-S: in vitro (149)

Säureproduktion: - basal, kein Einfluß → Hund: IZ (326); Kaninchen: ID (197) - Hemmung der Wirkung von Phosphodiesterase-Hemmstoffen → Hund: IZ (326); Kaninchen: ID (197); Ratte: IZ (293) - Hemmung der Histamin-Wirkung → Hund: IZ (319,326,327,329); Kaninchen: IZ (336), ID (197); Ratte: IZ (293)

H.4.4 Interaktion Histamin - Ethanol

Topische Applikation von Ethanol bewirkte bei der Ratte in vivo eine Hemmung der basalen sowie der Histamin-, Carbachol- und Pentagastrin-stimulierten Säuresekretion (249,250,252). Bei i.v Applikation konnte dagegen kein Effekt beobachtet werden (249). In höheren Konzentrationen hatte Ethanol eine stark magenschleimhautreizende Wirkung (131,209) und führte zu einer Stimulation der Magenschleimsekretion (1).

Ethanol beeinflußte den basalen cAMP-Spiegel der IZ nicht nachweisbar, führte aber in niedriger Konzentration zu einer Verstärkung und in hoher Konzentration zu einer starken Hemmung des Histamin-Effektes. Die schon veröffentlichten in vivo und in vitro Arbeiten über Ethanol-Wirkungen am Magen weisen auf große Unterschiede in Abhängigkeit von der verwendeten Species und den geprüften Konzentrationen hin. Bei der Ratte wurde dabei übereinstimmend eine Reduktion des cAMP-Gehaltes der Magenmukosa beobachtet (Literatur s. Kapitelende).

Bezüglich der Interaktion Histamin - Ethanol auf das cAMP-System isolierter Magenzellen existieren nur unvollständige Angaben. So zeigte bis jetzt nur Soll (326), daß 1,3% Ethanol die Histamin-Wirkung auf den cAMP-Spiegel isolierter Hundezellen nicht beeinflußte, jedoch die histaminerge Säureproduktion eindeutig reduzierte. Ethanol beeinflußt das cAMP-System verschiedener Gewebe in komplexer Weise [übersicht bei (379)]. Der Hemmung des Histamin-Effektes durch höhere Ethanol-Konzentrationen könnte möglicherweise eine Schädigung der Histamin-empfindlichen AC durch Protein-Denaturierung zugrunde liegen. Ein solcher unspezifischer Mechanismus wäre dann auch eine Erklärung für

die Hemmung der Natriumfluorid-stimulierten AC der Rattenmagenschleimhaut durch Ethanol (249,355). In diesem Zusammenhang wurde aber auch eine Stimulation der Prostaglandinsynthese durch Ethanol mit resultierender Hemmung der Histamin-Wirkung postuliert (252).

Die beobachtete Erhöhung des cGMP-Spiegels durch Ethanol steht möglicherweise im Widerspruch zu den Ergebnissen von Vesely und Levey, die eine Hemmung der GC der Magenschleimhaut fanden (376). Allerdings waren dazu höhere Ethanol-Konzentrationen erforderlich.

Literatur: Wirkungen von Ethanol in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - Hemmung → Meer-S: in vitro (389); Ratte: in vitro (249) - kein Einfluß → Hund: in vitro (100) - Stimulation → Mensch: in vitro (183)

cAMP-Phosphodiesterase: - Hemmung → Hund: in vitro (251); Meer-S: in vitro (389); Mensch: in vitro (183); Ratte: in vitro (249,355)

cAMP-Spiegel: - Erniedrigung → Ratte: in vitro (249), in vivo (249, 250); Hund: in vitro [(251), konzentrationsabhängig aber auch Stimulation] - Stimulation → Mensch: in vitro (183)

H.4.5 Interaktionen Histamin - andere Substanzen

Während Adenosin und Glucagon den Histamin-Effekt auf den cAMP-Spiegel der IZ nicht signifikant beeinflußten, führten Dopamin, Adrenalin und Trijodthyronin zu einer signifikanten Hemmung, womit diese Substanzen als potentielle Inhibitoren der Histamin-stimulierten AC in Frage kommen. Bis jetzt wurden hierzu nur wenige Daten veröffentlicht. So waren in isolierten Rattenmagendrüsen die stimulierenden Effekte von Histamin und Glucagon auf den cAMP-Spiegel nicht additiv (139), während Histamin und Adrenalin eine additive Wirkung auf die AC aus menschlicher Magenschleimhaut hatten (312). Aus der hier vorliegenden Untersuchung geht hervor, daß die in einigen Arbeiten [z.B. (83,208)] in vivo beschriebene inhibitorische Wirkung von Glucagon [in isolierten Ratten- (296) und Hundemagenzellen (242) aber nicht nachweisbar] auf die histaminerge Säuresekretion wahrscheinlich nicht über eine direkte Interaktion am Histamin-empfindlichen cAMP-System zustande kommt. Eine indirekte Wirkung über die Freisetzung von So-

matostatin (80) wäre aber denkbar. Demgegenüber müssen Dopamin, Adrenalin und möglicherweise auch Trijodthyronin als Substanzen angesehen werden, die über dieses System auf die histaminerge Säureproduktion der PZ dämpfend einwirken. In der Tat konnte ein solcher antisekretorischer Effekt für ß-Sympathomimetika [in IZ der Ratte (222) und in vivo (54)] und für Dopamin [in vivo (374)] bereits nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen über mögliche Korrelationen zwischen der Hemmung des Histamin-stimulierten cAMP-Spiegels und der Hemmung der histaminergen Säureproduktion durch diese Substanzen erscheinen aber nötig, um die physiologische Relevanz der hier erhaltenen Ergebnisse zu klären.

Die Effekte von Forskolin und Histamin auf den cAMP-Spiegel der IZ waren überadditiv. Dies bestätigt Untersuchungen in denen eine potenzierende Interaktion zwischen diesen Substanzen auch in isolierten Kaninchenmagendrüsen (165) und im Ratten-Hippocampus (304) gefunden wurde. Wie Hersey et al (165) zeigten, kommt es dabei durch niedrige Forskolin-Konzentrationen auch zu einer Potenzierung der histaminergen Säureproduktion isolierter Kaninchendrüsen. Die maximalen Histamin- und Forskolin-Effekte waren aber nicht additiv. Dies deutet darauf hin, daß durch beide Substanzen die maximale Säureproduktion erreicht werden kann und Potenzierungen bei submaximalen Konzentrationen durch unterschiedliche Angriffspunkte am Effektorsystem - H_2-Rezeptor und katalytische Einheit (305)/GTP-abhängiges Regulatorprotein (89) - zustande kommen.

H.5 Cholinerge Substanzen

Cholinergika stimulierten in vivo die Säure-, Pepsin-, Alkali- und Schleimproduktion der Magenschleimhaut (124,191). Die beiden ersten Wirkungen konnten auch schon in isolierten Präparationen nachgewiesen werden (Literatur s. Kapitelende).

Im Zellgemisch führten sie in Anwesenheit von IBMX zu einer durch Atropin hemmbaren Stimulation des cAMP-Spiegels. Damit scheint ihre Wirkung in isolierten Rattenzellen qualitativ von der in isolierten Präparationen anderer Species verschieden zu sein (Literatur s. Kapitelende). Ausgehend von den bisher veröffentlichten Daten und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Carbachol in den einzelnen Zellfraktionen keine signifikante Stimulation bewirken konnte, wäre fol-

gende Erklärung möglich: Die Stimulation des cAMP-Spiegels durch Cholinergika erfolgte indirekt durch freigesetztes Histamin (212). Dies würde bedeuten, daß die Histamin-speichernden Zellen der Ratte - die sogenannten enterochromaffin-ähnlichen Zellen (270,330) - im Unterschied zu den morphologisch differenten Mastzellen der anderen Tierarten auf cholinerge Stimulation mit einer Histamin-Freisetzung reagieren. Die fehlende Stimulation in den einzelnen Zellfraktionen könnte durch eine Abtrennung der Histamin-haltigen Zellen von den Zielzellen der Histamin-Wirkung (= PZ), oder aber auch direkt durch den mit Percoll durchgeführten Zellpräparationsvorgang bedingt sein. Es ist denkbar, daß durch diese Prozedur die Histamin-Speicher bereits entleert wurden und cholinerge Substanzen keine indirekte Wirkung mehr auslösen konnten.

Für die biphasige Erhöhung des cGMP-Spiegels in Nicht-PZ durch Cholinergika liegen in isolierten Präparationen noch keine Vergleichswerte vor. Die in in vitro und in vivo Systemen gewonnenen Ergebnisse sind widersprüchlich (Literatur s. Kapitelende) und führen in der Erklärung dieses Phänomens nicht weiter. Die eigenen Daten sind jedoch in Übereinstimmung mit Ergebnissen in anderen Geweben (z.B. Lunge, Schilddrüse, Pankreas), in welchen eine Stimulation des cGMP-Spiegels durch Cholinergika nachgewiesen werden konnte (145,227). Da die cGMP-Erhöhung in den Nicht-PZ ablief, sind Schleim- und Hauptzellen als wahrscheinlichster zellulärer Ort dieser Veränderungen anzunehmen. Ob die physiologischen, durch Cholinergika stimulierbaren Leistungen dieser Zelltypen (Schleim-, Bikarbonat- und Pepsin-Sekretion) eventuell cGMP-abhängig sind und ob die Erhöhung des cGMP-Spiegels wirklich über die cholinergen Rezeptoren der Magenzellen (107,108) vermittelt wird, kann aufgrund dieser Untersuchungen nicht entschieden werden. Eine Beteiligung von cAMP und cGMP an der cholinergen Säuresekretion erscheint jedoch aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse als sehr unwahrscheinlich.

Literatur: Wirkungen von Cholinergika in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (233); Hund: in vitro (101, 366); Kaninchen: in vitro (366); Meer-S: in vitro (5,6.149,243,366); Ratte: IZ (31,365), in vitro (366,368) - Stimulation → Frosch: in vitro (257,258)

cAMP-Phosphodiesterase: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (256,257)

cAMP-Spiegel: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (76); Hund: IZ (325, 329); Meer-S: IZ (19), in vitro (239) - Stimulation → Ratte: in vivo (234,273,274,275,278,279)

cGMP-Spiegel: - kein Einfluß → Hund: in vivo (198); Meer-S: in vitro (61), in vivo (61); Ratte: in vivo (273) - Stimulation → Frosch: in vitro (111); Hund: in vivo (74,109,110,370); Meer-S: in vitro (239)

GC: - kein Einfluß → Hund: in vitro (370); Meer-S: in vitro (149) - Stimulation → Ratte: in vitro (2)

Pepsinogensekretion: - Stimulation → Kaninchen: ID (161,184,187)

Säureproduktion: - Stimulation → Hund: IZ (326,328,329,332,333,334, 339); Kaninchen: ID (35,36,37,40,79); Meer-S: IZ (21,22); Mensch: ID (119,151); Ratte: IZ (92,107,266,267,268,341)

Sauerstoffverbrauch: - Stimulation → Hund: IZ (332,335,337,338); Kaninchen: ID (36,37,38,39); Ratte: IZ (259)

H.6 Pentagastrin

In vivo führte Gastrin zu einer zuverlässigen Stimulation der Säure- und Pepsinsekretion [übersicht bei (180)], wobei die Funktion der im Magenkorpus gefundenen Gastrin-Rezeptoren (178,203,204,210,343,344, 357,358,359) aber noch unklar ist. In isolierten Präparationen bewirkte Gastrin eine Stimulation der Kalium-Aufnahme, der Pepsinogen-Freisetzung sowie eine geringfügige Erhöhung der Säureproduktion und des Sauerstoffverbrauchs. Die beiden letzten Effekte wurden aber nicht in allen Präparatiuonen und oft nur in Anwesenheit von Phosphodiesterase-Hemmstoffen gefunden (Literatur s. Kapitelende).

Pentagastrin induzierte eine kurzfristige Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Nicht-PZ, während es diesen in isolierten Präparationen anderer Species nicht zu stimulieren vermochte (Literatur s. Kapitelende). Die bisher veröffentlichten Werte über Gastrin-Wirkungen auf das cAMP-System der Ratte sind widersprüchlich. So wurde in isolierten Rattenzellen teils eine stimulierende (203), teils keine Wirkung

auf die AC gefunden (31,365). Ursache dieser Differenzen könnte möglicherweise eine in manchen Präparationen im Lauf der Zellisolierung eingetretene Zerstörung der Gastrin-Rezeptoren sein (210). Ob ein Teil der Gastrin-Wirkung im Zellgemisch auch über eine Histamin-Freisetzung zustande kommt (274), läßt sich aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse noch nicht entscheiden.

Der cGMP-Spiegel der IZ wurde durch Pentagastrin nicht beeinflußt und dies steht in Einklang mit der Mehrzahl der bislang in vivo und in vitro durchgeführten Arbeiten. Eine Ausnahme stellt die von Vesely et al beobachtete Stimulation des cGMP-Spiegels der Magenschleimhaut in vitro durch Gastrin-Derivate dar (375). Diese Daten sollten jedoch mit einer gewissen Skepsis betrachtet werden, da die basalen cGMP-Spiegel unrealistisch hoch waren (s. Tb 11) und deshalb die Validität der cGMP-Bestimmungen ernsthaft angezweifelt werden muß.

Aufgrund der eigenen Ergebnisse scheint eine Beteiligung der cyclischen Nukleotide an der gastrinergen Säuresekretion unwahrscheinlich. Möglicherweise kommt dem cAMP jedoch eine Transmitterfunktion in der Gastrin-stimulierten Pepsinogensekretion zu, was aber erst durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden kann.

Literatur: Wirkungen von Gastrin in der Korpus-Magenschleimhaut

AC: - kein Einfluß → Hund: in vitro (84); Kaninchen: IZ (77), in vitro (366); Meer-S: in vitro (5,6,149,243,366); Ratte: IZ (31,365), in vitro (42,167,366,368) - Stimulation → Frosch: in vitro (233,257, 258); Mensch: in vitro (32,33); Ratte: IZ (203), in vitro (12,204, 205,232), bei in vivo-Vorbehandlung (167)

cAMP-Phosphodiesterase: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (256,257)

cAMP-Spiegel: - kein Einfluß → Frosch: in vitro (76); Hund: IZ (325, 329), in vivo (220); Kaninchen: ID (77); Meer-S: IZ (19); Mensch: in vivo (96,200) - Stimulation → Meer-S: in vitro (239); Ratte: in vivo (234,273,274,279)

cGMP-Spiegel: - kein Einfluß → Hund: in vivo (73,109,110,198,360); Meer-S: in vitro (239); Mensch: in vivo (200,360); Ratte: in vivo (273) - Stimulation → Ratte: in vitro (375)

GC: - kein Einfluß → Kaninchen: in vitro (351); Meer-S: in vitro (149) - Stimulation → Frosch: in vitro (10); Ratte: in vitro (375)

Kalium-Aufnahme: - Stimulation → Meer-S: IZ (29)

Pepsinogen-Freisetzung: - Stimulation → Kaninchen: ID (164,184)

Säureproduktion: - kein Einfluß → Kaninchen: ID (36); Meer-S: IZ (22); Mensch: ID (151); Ratte: IZ (92) - Stimulation → Hund: IZ (326,328,329,332,333,334,339,394); Kaninchen: ID (35,40,77,79,164)

Sauerstoffaufnahme: - kein Einfluß → Kaninchen: ID (36) - Stimulation → Hund: IZ (332,335,337,339); Kaninchen: ID (77,79)

H.7 Adrenerge Substanzen

H.7.1 Adrenerge Agonisten

In vivo führten Sympathomimetika zu einer Erhöhung der Pepsinsekretion (16). Ihre Wirkungen auf die basale und histaminerge Säuresekretion werden aber nicht einheitlich beurteilt. Zwar wurde überwiegend eine Hemmung beobachtet [Übersicht bei (16,54)], jedoch konnte auch eine Stimulation der Säureproduktion durch ß-Sympathomimetika im isolierten Rattenmagen (64,65) und bei in vivo Untersuchungen an der Ratte (361) nachgewiesen werden. In IZ stimulierten ß-Sympathomimetika die Pepsinogen- und Intrinsic-Faktor-Sekretion und eventuell auch in geringem Umfang die Säureproduktion (Literatur s. Kapitelende).

Die Untersuchungsergebnisse bieten erstmals detailierten Einblick in die pharmakologische Beeinflussung der cyclischen Nukleotidspiegel der IZ durch Sympathomimetika. Adrenerge Agonisten führten über einen ß-adrenergen Mechanismus zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Stimulation des cAMP-Spiegels, der vorwiegend in Nicht-PZ lokalisiert war. Dies wird belegt durch die größere Potenz und Effizienz von Adrenalin und des selektiven ß-Sympathomimetikums Hexoprenalin im Vergleich zu den geprüften α-Sympathomimetika Noradrenalin, Phenylephrin und Naphazolin. Ferner dadurch, daß die adrenerge Stimulation durch den ß-Rezeptorenblocker Propranolol gehemmt wurde, während der α-Rezeptorenblocker Phentolamin keine oder nur geringe Wirkung auf-

wies. Die bis jetzt veröffentlichten Daten bestätigen das Vorkommen ß-sympathomimetischer Stimulation in der Magenschleimhaut und auch deren Lokalisation in Nicht-PZ (187,193,277,311), deuten aber auch auf mögliche Species-Unterschiede hin (Literatur s. Kapitelende).

Die ebenfalls vorwiegend in Nicht-PZ lokalisierte adrenerge Stimulation des cGMP-Spiegels war dagegen weder durch α-, noch durch ß-Rezeptorenblocker zu hemmen. Dies und die Tatsache, daß auch das vorwiegend indirekt wirkende Sympathomimetikum Ephedrin (obwohl ohne Einfluß auf den cAMP-Spiegel) den cGMP-Spiegel zu stimulieren vermochte, deutet auf eine rezeptorunabhängige Beeinflussung der GC hin. Wie auch schon in anderen Testsystemen beschrieben (206,226,227,229), könnten dabei durch Oxidation adrenerger Substanzen intermediär gebildete Hydroxylradikale den Oxidationszustand der GC verändern und so deren Aktivierung bewirken. Ein bereits oxidiertes Derivat des Adrenalins - Adrenochrom - blieb dagegen ohne Einfluß auf das zelluläre cGMP. Die Stimulation des cGMP-Spiegels durch Adrenalin erfolgte langsamer (Maximum 5 ↔ 15min) und mit einer geringeren Potenz (EC_{50} 390nmol/l ↔ 100µmol/l) und Effizienz (maximale Stimulation 181% ↔ 88%) als die des cAMP-Spiegels. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führten adrenerge Agonisten auch zu einer Stimulation des cGMP-Spiegels in der Ratte in vivo (271,276) (allerdings durch α-Rezeptorenblocker hemmbar) und der GC-Aktivität in der Froschmagenschleimhaut (10).

Das Konzept einer Beteiligung von cAMP an der adrenergen Pepsinogensekretion (187) wird durch die eigenen Ergebnisse voll unterstützt, eine Funktion in der adrenergen Intrinsic-Faktor Sekretion erscheint denkbar. Das der eher unspezifischen Stimulation des cGMP-Spiegels durch Sympathomimetika eine physiologische Bedeutung zukommt ist dagegen unwahrscheinlich. Neben ihren stimulierenden Eigenschaften scheinen die Sympathomimetika auch einen hemmenden Einfluß auf den Histamin-stimulierten cAMP-Spiegel und damit eventuell auch der histaminergen Säureproduktion zu haben (s. Kap H.4.5).

Literatur: Wirkungen von Sympathomimetika in der Korpus-Magenschleimhaut

α-Sympathomimetika

AC: - kein Einfluß → Meer-S: in vitro (5,6); Ratte: IZ (Methoxamin) (365), in vitro (367) - Stimulation → Ratte: IZ (Noradrenalin) (365)

cAMP-Spiegel: - kein Einfluß → Ratte: in vivo (276) - Stimulation → Meer-S: in vitro (182)

ß-Sympathomimetika

AC: - kein Einfluß → Hund: in vitro (366); Kaninchen: in vitro (366); Meer-S: in vitro (5,6,366) - Stimulation → Hund: in vitro (272); Kaninchen: IZ (161,166,187); Maus: in vitro (272); Meer-S: in vitro (272); Mensch: in vitro (272,277,311,312); Ratte: IZ (272,365), in vitro (272,366,367,368); Schwein: in vitro (272)

cAMP-Spiegel: - Stimulation → Kaninchen: ID (161,165,187); Ratte: IZ (272), in vivo (271,276)

Intrinsic-Faktor-Sekretion: - Stimulation → Mensch: IZ (297,298); Ratte: IZ (296,298)

Pepsinogen-Sekretion: - Stimulation → Kaninchen: ID (161,187)

Säureproduktion: - kein Einfluß: Kaninchen: ID (187) - Stimulation: Ratte: IZ (222,272)

Interaktion ß-Sympathomimetika - α-Rezeptorenblocker

AC: - keine Hemmung → Ratte: IZ (365) - Hemmung → Ratte: IZ (272)

cAMP-Spiegel: - keine Hemmung → Ratte: in vivo (276)

Interaktion ß-Sympathomimetika - ß-Rezeptorenblocker

AC: - Hemmung → Ratte: IZ (272,365), in vitro (367)

cAMP-Spiegel: - Hemmung → Kaninchen: ID (187); Ratte: in vivo (276)

H.7.2 Adrenerge Rezeptorenblocker

In vivo bewirkte Phentolamin eine Steigerung der Säuresekretion, während andere α-Rezeptorantagonisten eher antisekretorische Eigenschaften hatten (16,54). ß-Rezeptorenblockern lassen sich zur Zeit noch keine eindeutigen Wirkungen auf die Säuresekretion in vivo zuordnen (16,54).

Der adrenerge ß-Rezeptorantagonist Propranolol, der α-Rezeptorenblocker Phentolamin sowie das indirekte Sympathomimetikum Ephedrin hatten keinen Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel. Dies deutet darauf hin, daß in dem verwendeten isolierten Zellsystem eine endogene adrenerge Stimulation der basalen cAMP-Formation ausgeschlossen werden kann und auch keine zur Stimulation ausreichenden Mengen an Adrenalin oder Noradrenalin freigesetzt werden können. Im Gegensatz zur Erniedrigung des basalen cGMP-Spiegels der IZ durch Propranolol und Phentolamin hatten α- und ß-Rezeptorenblocker keinen ausgesprochenen Einfluß auf den basalen cGMP-Spiegel in der Ratte in vivo (271,276).

Literatur: Wirkungen von adrenergen Rezeptorantagonisten in der Korpus-Magenschleimhaut

α-Rezeptorenblocker:

AC: - kein Einfluß → Ratte: IZ (365)

cAMP-Spiegel: - kein Einfluß → Ratte: in vivo (271,276)

ß-Rezeptorenblocker:

AC: - kein Einfluß → Ratte: IZ (365)

cAMP-Spiegel: - kein Einfluß → Kaninchen: ID (187); Ratte: in vivo (271,276)

H.8 Prostaglandine und Präkursoren

$PGF_{2\alpha}$ hat in vivo keine (16,265) und in isolierten Hundezellen (319) eine wesentlich geringere Hemmwirkung auf die Säureproduktion als PGE_2. Es stimuliert aber wie dieses, wenn auch mit geringerer Potenz, die Alkalisekretion (124) und besitzt "cytoprotective" Eigenschaften (263). In einer Konzentration von 1µmol/l beeinflußte es das zelluläre cAMP nicht nachweisbar. Dies bestätigt Untersuchungen, in denen dieses Prostaglandin-Derivat erst in höheren Konzentrationen den cAMP-Spiegel anzuheben vermochte (Literatur s. Kapitelende).

Arachidonsäure führte in isolierten Hundezellen (319) und in vivo (16,265) zu einer Hemmung der histaminergen Säureproduktion. Die Nichtbeeinflussung des basalen cAMP-Spiegels durch Arachidonsäure steht in Einklang mit in vitro Untersuchungen über ihren Einfluß auf die basale AC-Aktivität (Literatur s. Kapitelende). Sie zeigt gleichzeitig, daß während der Inkubation keine zur Stimulation des cAMP-Spiegels ausreichenden Prostaglandin-Mengen aus der Arachidonsäure synthetisiert wurden. Da eine Hemmung des Histamin-Effektes jedoch schon durch wesentlich geringere Prostaglandin-Konzentrationen hervorgerufen wird (s. Kap H.4.3), läßt sich die mögliche Synthese solcher inhibitorisch wirkender Prostaglandin-Mengen aufgrund der eigenen Daten nicht ausschließen. Da in einigen anderen Geweben (z.B. Leber, Lunge) eine Stimulation des cGMP-Spiegels durch Arachidonsäure beobachtet wurde (227), lag die Vermutung einer ähnlichen Wirkung in den IZ nahe. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen.

Literatur: Wirkungen von Prostaglandinen und Präkursoren in der Korpus-Magenschleimhaut

$PGF_{2\alpha}$:

AC: - Stimulation → Hund: in vitro (101); Mensch: in vitro (318); Ratte: in vitro (367)

cAMP-Spiegel: - Stimulation → Hund: IZ (215)

Arachidonsäure:

AC: - kein Einfluß → Hund: in vitro (101); Meer-S: in vitro (102, 389)

H.9 Stoffe, die zur Bildung von NO führen können

Nach Befunden von Hersey (162) und Cazottes et al (66) führten Natriumazid und Natriumnitrit zu einer Hemmung der Säureproduktion in isolierten Kaninchenmagendrüsen und in der Ratte in vivo.

In den IZ bewirkten Natriumnitroprussid, Hydroxylamin, Natriumazid, Natriumnitrit und Hydraziniumsulfat, wie auch in den meisten anderen bis jetzt untersuchten Geweben (226,229,230), eine ausgesprochen starke Stimulation des cGMP-Spiegels, wobei dieser Effekt eventuell über intermediär gebildetes NO vermittelt wird (226). Der cAMP-Spiegel wurde dagegen nicht oder nur geringfügig angehoben. Die Aktivierung der GC scheint sich auf die lösliche Form zu beschränken (10, 149), da die partikuläre GC nicht beeinflußt wird (149).

Ob über die starke Stimulation des cGMP-Spiegels durch diese Stoffe funktionelle Reaktionen der Magenschleimhaut, wie z.B. die beobachtete Hemmung der Säuresekretion, ausgelöst werden, läßt sich aufgrund der spärlichen Daten zu diesem Problem und zu sonstigen Wirkungen dieser Substanzgruppe am Magen noch nicht entscheiden.

H.10 Thiole

SH-reaktive Substanzen scheinen eine "cytoprotective" Wirkung auf die Magenschleimhaut auszuüben (13,354). Die Thiole DTT, L-Cystein und 2-Mercaptoethanol führten in Anwesenheit von IBMX zu einer ausgeprägten Erhöhung des basalen cGMP-Spiegels der IZ, hatten aber keine oder nur geringe Wirkung auf das zelluläre cAMP. In Übereinstimmung hiermit steht die Beobachtung, daß Cystein in vitro zu einer Aktivierung der löslichen GC des Meerschweinchenmagens führte (die partikuläre GC wurde aber eher gehemmt) (149). In anderen Geweben wurden für Thiole teils stimulierende (47,48), teils hemmende (148,150) Wirkungen auf den cGMP-Spiegel festgestellt. Die Ursache dieser Unterschiede ist noch unklar (229).

H.10.1 Interaktion DTT - andere Substanzen

DTT hemmte den Adrenalin-Effekt auf den cAMP-Spiegel, blieb aber ohne nachweisbaren Einfluß auf die Stimulation des zellulären cGMPs durch Adrenalin und Carbachol. Diese Beobachtungen und die Verstärkung der histaminergen und gastrinergen Säureproduktion durch DTT in isolierten Kaninchenmagendrüsen (77,164) zeigen, daß Thiole die Wirkung anderer Stoffe auf die Magenschleimhaut und auf andere Gewebe (144) in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. Das sollte Anlaß geben, die allgemeine Verwendung SH-protektiver Substanzen bei biochemischen Untersuchungen, z.B. zur Reduzierung des Zellklumpens oder bei der Bestimmung der AC-Aktivität, kritisch zu überdenken.

H.11 Nicht-steroidale Antirheumatika

Diese Substanzgruppe wurde untersucht, da nicht-steroidale Antirheumatika mit ihren ausgeprägten Wirkungen an der Magenschleimhaut (241,310), die sich im ungünstigsten Fall als Ulkus-Bildung äußern, möglicherweise am System der cyclischen Nukleotide angreifen. Die ulcerogene Wirkung wird dabei mit ihrer auch in isolierten Präparationen nachgewiesenen (197,320) hemmenden Wirkung auf die Prostaglandinsynthese (127) in Verbindung gebracht. Da Prostaglandine das cAMP-System in Nicht-PZ aktivieren, wäre es denkbar, daß nicht-steroidale Antirheumatika durch Hemmung dieser Wirkung das Gleichgewicht der cyclischen Nukleotide stören.

Indometacin 100µmol/l hatte aber keinen Einfluß auf den basalen cAMP-Spiegel. Dies entspricht Untersuchungen mit Magenschleimhautgewebe des Meerschweinchens (102), der Ratte (69) und des Hundes (199,319), in denen ebenfalls keine Beeinflussung der basalen AC- und Phosphodiesterase-Aktivität in vitro bzw des cAMP-Spiegels in vivo unter dieser Konzentration gefunden wurde. Simon et al (313) konnten jedoch zeigen, daß Indometacin in anderen Konzentrationsbereichen die AC-Aktivität der menschlichen Magenschleimhaut sowohl zu stimulieren als auch zu hemmen vermochte.

Auch Acetylsalicylsäure hatte keinen Einfluß auf den cAMP-Gehalt der IZ. Die bis jetzt veröffentlichten Daten über Acetylsalicylsäure-Wirkungen sind widersprüchlich. Während die AC der Magenschleimhaut des Menschen nicht beeinflußt wurde (313), ergab sich für die AC der

Ratte bei in vivo Vorbehandlung und bei in vitro Untersuchungen eine Stimulation (217). Auch der cAMP-Gehalt wurde bei in vivo Versuchen durch die chemisch verwandte Salicylsäure (in hoher Konzentration) angehoben (228). Der cAMP-Spiegel in einer Kaninchen-Magenzellkultur wurde dagegen erniedrigt (224).

Im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen bewirkte Aminopyrin eine schwache Erhöhung des cAMP-Spiegels. Dazu existieren bis jetzt keine Vergleichswerte. Dieser Befund ist von gewisser Bedeutung, da Aminopyrin zur indirekten Messung der Säureproduktion isolierter Präparationen verwendet wird (36). Es erscheint somit ratsam keine zu hohen Konzentrationen dieser Substanz zur Bestimmung der Säureproduktion der PZ einzusetzten. Dies ist auch nicht erforderlich, da Konzentrationen von 10 - 100nmol/l völlig ausreichend sind.

Da die geprüften Antirheumatika keinen wesentlichen Einfluß auf die basalen cAMP-Spiegel der IZ ausübten, kann man mit ziemlicher Sicherheit davon ausgehen, daß die Prostaglandin-Synthese in diesem System unter basalen Bedingungen keine Prostaglandin-Konzentrationen unterhält, die zu einer Aktivierung des cAMP-Systems in NichtPZ führen (s. auch Kap H.8). Da andererseits die getesteten Konzentrationen der Antirheumatika ausreichend waren um unter in vivo Bedingungen die Ulkusentstehung zu fördern, lassen die Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und der Beeinflussung der Prostaglandin-Wirkung auf das cAMP-System der Nicht-PZ erkennen.

Alle drei untersuchten Substanzen konnten auch den cGMP-Spiegel der IZ nicht beeinflussen. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, daß Indometacin beim Hund in vivo keine Wirkung auf den cGMP-Gehalt der Magenschleimhaut hatte (199). Somit erscheint auch für dieses cyclische Nukleotid eine Beteiligung am pathologischen Mechanismus der Ulkusentstehung durch Antirheumatika als sehr unwahrscheinlich.

H.12 Trijodthyronin und Calcitonin

Die mit Trijodthyronin beobachtete Stimulation des cAMP-Spiegels steht in gewissem Einklang mit den Ergebnissen, die in einer in vivo Untersuchung an der Ratte, allerdings bei Langzeitanwendung, gewonnen wurden (117). Für die durch Trijodthyronin bewirkte vollstandige Hemmung des in den PZ lokalisierten Histamin-Effektes auf den cAMP-Spie-

gel (s. Kap H.4.5) liegen dagegen noch keine Vergleichswerte vor. Da Trijodthyronin ein Hormon ist, daß seine Wirkung nach heutigem Wissensstand über Kernrezeptoren und nicht durch eine direkte Stimulation des cAMP-Systems ausübt (30), wären folgende Erklärungsmöglichkeiten denkbar. 1. Trijodthyronin erhöht bzw vermindert (Hemmung des Histamin-Effektes in den PZ) die Stimulierbarkeit der AC durch Agonisten, wie dies z.B. auch in der Fettzelle beobachtet wurde (113,216) 2. Trijodthyronin wirkt indirekt durch Freisetzung einer in den IZ gespeicherten Mediatorsubstanz 3. Trijodthyronin bewirkt eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase (7) und führt dadurch zur Erhöhung des cAMP-Spiegels. Da die cAMP-Phosphodiesterase jedoch bereits durch IBMX gehemmt war, ist diese Erklärung ziemlich unwahrscheinlich. Während Thyroxin in der Ratte bei Langzeitanwendung in vivo zu einer Erniedrigung des cGMP-Gehaltes der Magenschleimhaut führte (117), beeinflußte Trijodthyronin den cGMP-Spiegel der IZ nicht nachweisbar.

Das Polypeptidhormom Calcitonin ist in vivo ein Inhibitor der basalen und stimulierten Säure- und Pepsinsekretion (170,244). In den IZ führte es wie auch in anderen Geweben (z.B. Knochen) (15,157) zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels, ohne das zelluläre cGMP zu beeinflussen.

Ob der Stimulation des cAMP-Spiegels durch Trijodthyronin und Calcitonin eine physiologische Bedeutung zukommt, ist im Moment noch unklar.

H.13 Pankreas-Hormone

Das Polypeptidhormon Insulin stimuliert in vivo die Säureproduktion, wobei diese Wirkung wahrscheinlich indirekt über eine Hypoglykämie-induzierte Vagusreizung zustande kommt (275). Es hatte keinen Einfluß auf die basalen Spiegel der cyclischen Nukleotide. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, die für den cAMP-Spiegel isolierter Meerschweinchenzellen (19) und die AC-Aktivität der Rattenmagenschleimhaut (368) gewonnen wurden. Die in vivo beobachtete Stimulation des cAMP-Spiegels in der Magenschleimhaut der Ratte (274,275, 278) und des cGMP-Spiegels im Hundemagen (109) wurden dagegen wohl indirekt über eine Vaguserregung hervorgerufen, die mit einer Freisetzung von Histamin und Acetylcholin einhergehen kann. Die Wirkung

von Insulin auf die cAMP-Systeme anderer Gewebe ist noch strittig (378). So wurde für das Fettgewebe teils eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels (55), eine Hemmung der AC (159) und eine Stimulation der cAMP-Phosphodiesterase (7) gefunden, teils aber auch kein Effekt beobachtet (194).

Das Polypeptid Glucagon gilt als Hormon mit Hemmwirkung auf die basale und gastrinerge Säure- und Pepsinsekretion. Die histaminerge Sekretion wird dagegen weniger eindeutig beeinflußt (16,180). Es hatte keine nachweisbare Wirkung auf den basalen cAMP-Spiegel der IZ. Dies steht im Widerspruch zu der sehr starken (40fachen), wahrscheinlich in PZ lokalisierten Stimulation des cAMP-Spiegels in isolierten Rattenmagendrüsen (17,18,139) und zu der Aktivierung einer AC in isolierten Rattenmagenzellen (295). Andererseits konnte Glucagon den cAMP-Spiegel in IZ des Meerschweinchens (19) und bei in vivo Versuchen mit der Ratte (278) nicht erhöhen und in vitro war kein Einfluß auf die AC-Aktivität der Magenschleimhaut des Menschen (314,315) und nur eine schwache Wirkung auf die der Ratte (366,368) nachweisbar. Zur Erklärung dieser Unterschiede wären folgende Möglichkeiten denkbar: 1. Glucagon wirkt indirekt (durch Freisetzung einer Mediatorsubstanz) auf den cAMP-Spiegel und kann diese Wirkung nur in intakten ID entfalten 2. Glucagon wirkt direkt auf den cAMP-Spiegel, aber die dazu notwendigen Rezeptoren wurden im Laufe der Zellisolierung beschädigt 3. Da Glucagon in endokrinen Zellen des Magenkorpus vorkommt (168,195), wäre eine Freisetzung aus diesen Zellen ins Inkubationsmedium während der Zellisolierung möglich und mit exogenem Glucagon keine zusätzliche cAMP-Antwort mehr zu erzielen. Da kein Glucagon-Antagonist erhältlich war, dessen Wirkung auf den basalen cAMP-Spiegel hätte geprüft werden können, muß diese Frage offen bleiben. Bezüglich der Interaktion Histamin - Glucagon s. Kap H.4.5

H.14 Gastrointestinale Hormone

In vivo führte das Polypeptidhormon Pankreozymin (Synonym Cholecystokinin) zu einer Stimulation der basalen Säure- und Pepsinsekretion (16,180). Auch in isolierten Kaninchendrüsen bewirkte es eine Zunahme der Pepsinogensekretion (161,184). Widersprüchlich sind dagegen die Daten über eine Stimulation der basalen Säureproduktion isolierter Kaninchenmagendrüsen (164) und über eine Hemmung der basalen und histaminergen Säureproduktion isolierter Rattenmagenzellen (294).

Pankreozymin erhöhte den cAMP-Spiegel der IZ. Aufgrund der Strukturanalogie zum Gastrin (180) ist ein Angriffspunkt an dessen Rezeptoren denkbar. Dieser Effekt ist in Übereinstimmung mit dem Einfluß von Pankreozymin auf die AC-Aktivität der Rattenmagenschleimhaut (368). Der cAMP-Spiegel isolierter Meerschweinchenmagenzellen blieb dagegen unbeeinflußt (19) und die cAMP-Phosphodiesterase der Kaninchenmagenschleimhaut wurde stimuliert (3), was die Frage von Species-Unterschieden aufwirft. Obwohl eine Stimulation der löslichen GC des Meerschweinchenmagens beobachtet wurde (149) (die aber eventuell auf im Lösungsmittel enthaltenes Cystein zurückzuführen ist), hatte Pankreozymin keinen Einfluß auf den cGMP-Spiegel der IZ.

Aufgrund der vorliegenden Daten erscheint, in Analogie zu Gastrin (s. Kap H.6), eine Beteiligung von cAMP an der Pankreozymin-stimulierten Pepsinsekretion nicht ausgeschlossen. Bezüglich der Wirkungen von Somatostatin s. Kap H.4.2

H.15 Forskolin

Forskolin, ein kürzlich aus der indischen Pflanze Coleus Forskolii isoliertes Diterpen, bewirkte in isolierten Kaninchendrüsen eine Steigerung der Säure- und Pepsinogenproduktion und des Sauerstoffverbrauchs (161,164,165). Auch die Säuresekretion der isolierten Magenschleimhaut des Frosches wurde stimuliert (165).

Forskolin war das mit Abstand stärkste Stimulans der zellulären cAMP-Synthese mit einer in allen Zellfraktionen annähernd gleichstarken Wirkung. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und eine Aktivierung der AC durch Forskolin wurde auch in isolierten Kaninchenmagendrüsen (161, 165) und in allen anderen bis jetzt untersuchten Geweben gefunden (53,89,304). Forskolin aktiviert die AC über einen direkten Angriff an der katalytischen Einheit (305) und/oder dem GTP-abhängigen Regulatorprotein (89) des Enzyms.

Da die enormen Steigerungsraten der zellulären cAMP-Bildung und die entsprechende Zunahme der unterschiedlichen Sekretionsleistungen der Magenzellen gut übereinstimmen, ist die Beteiligung des "second messenger" cAMP an den beobachteten Forskolin-Wirkungen sehr wahrscheinlich.

H.16 Calcium

In vivo wurde die Säuresekretion der Ratte sowohl durch Erniedrigung als auch durch Erhöhung des normalen Calcium-Blutspiegels gehemmt (170). Calcium scheint keinen Einfluß auf die basale Pepsinogensekretion und eine eher hemmende Wirkung auf die basale Säureproduktion isolierter Zellpräparationen zu haben (Literatur s. Kapitelende).

Auch die AC des Meerschweinchen- (149,243) und Rattenmagens (355) wurde durch Calcium gehemmt. Entgegen diesen Befunden hatte Calcium keinen Einfluß (bei Zellisolierung in Calcium-freiem aber Magnesium-haltigem Medium B), oder aber eine eher stimulierende Wirkung (bei Zellisolierung in Calcium- und Magnesium-freiem Medium B) auf den cAMP-Spiegel der IZ. Der cGMP-Spiegel wurde durch Calcium 4mmol/l erniedrigt. Die lösliche GC des Frosch- (10) und Meerschweinchenmagens (149) konnten durch Calcium stimuliert werden, währernd die partikuläre GC des Meerschweinchenmagens nicht beeinflußt wurde (149).

H.16.1 Interaktion Calcium - andere Substanzen

Calcium-Entzug führte zu einer starken Reduktion der cholinergen Säure- und Pepsinsekretion und auch der adrenerge Effekt auf die Pepsinogenabgabe wurde vermindert. In geringerem Maße wurde auch die histaminerge und gastrinerge Säuresekretion gehemmt (Literatur s. Kapitelende).

Der Adrenalin-Effekt auf das zelluläre cGMP war in Gegenwart von 1 - 4mmol/l Calcium größer als in Calcium-freiem Medium. Die Wirkung auf den cAMP-Spiegel hatte ein Optimum bei einer Konzentration von 1mmol/l. Höhere oder niedrigere Calcium-Konzentrationen reduzierten den Effekt. Der Carbachol-Effekt auf den cGMP-Spiegel war dagegen in Calcium-freiem Medium am größten. Eine Stimulation durch Cholinergika in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium wurde auch in isolierten Pankreaszellen beobachtet (81), während in den meisten anderen Geweben eine Wirkung nur in Calcium-haltigem Medium zu erzielen war (227). Der konträre Einfluß von Calcium auf die adrenerge und cholinerge Stimulation könnte durch die unterschiedlichen GCs der Magenzellen bedingt sein. So wäre es denkbar, daß Adrenalin bevorzugt die lösliche, Calcium-abhängige (10,149,226) GC aktiviert, während Carbachol überwiegend an der partikularen, Calcium-unabhängigen (149) bzw

-hemmbaren (226) GC angreift.

Die Wirkung der Stimulantien in Gegenwart von EDTA ist schwierig zu interpretieren, da dieses, wie auch schon von Frey et al (130) im Nukleus Caudatus gezeigt, den zellulären Gehalt der cyclischen Nukleotide selber stiumulierte.

Literatur: Wirkungen von Calcium in der Korpus-Magenschleimhaut

Pepsinogen-Sekretion: - basal, kein Einfluß → Kaninchen: ID (184,187) - cholinerge und adrenerge Sekretion, Hemmung durch Calcium-Entzug → Kaninchen: ID (187)

Säureproduktion: - basal, kein Einfluß → Hund: IZ (339) - basal, Stimulation durch Calcium-Entzug → Kaninchen: ID (35) - histaminerge Sekretion, kein Einfluß → Kaninchen: ID (35) - histaminerge Sekretion, Hemmung durch Calcium-Entzug → Hund: IZ (339); Ratte: IZ (341) - cholinerge Sekretion, Hemmung durch Calcium-Entzug → Hund: IZ (339); Kaninchen: ID (35); Ratte: IZ (341) - gastrinerge Sekretion, Hemmung durch Calcium-Entzug → Hund: IZ (339)

H.17 Andere Substanzen

Serotonin

In vivo wurde eine Hemmung der Säure- und Pepsinsekretion und eine Stimulation der Magenschleimproduktion nach Gabe dieses biogenen Amins beschrieben (98). Die Säureproduktion isolierter Meerschweinchenmagenzellen wurde durch Serotonin dagegen nicht beeinflußt (20). Serotonin erhöhte den cAMP-Spiegel der IZ nur in ganz geringem Ausmaß, in Meerschweinchenmagenzellen konnte bis jetzt kein Effekt nachgewiesen werden (20,26).
Die in verschiedenen anderen Geweben gefundene Stimulation des cGMP-Spiegels durch Serotonin (227) ließ sich in den IZ nicht bestätigen.

Dopamin

Dopamin bewirkte eine wahrscheinlich in Nicht-PZ lokalisierte Stimu-

lation des cAMP-Spiegels der IZ. Da es die AC der Ratte bei Arbeiten mit IZ (365) und in vitro (367,368) nicht aktivieren konnte, wäre ein indirekter Mechanismus für diese Wirkung denkbar. Zur Überprüfung dieser Hypothese müßte aber die Freisetzung cAMP-stimuliernder Substanzen überprüft werden. Der cGMP-Gehalt der IZ wurde durch Dopamin, im Unterschied zu dem z.B. des Cerebellums (105), nicht beeinflußt. Bezuglich der Hemmung des Histamin-Effektes durch Dopamin s. Kap H.4.5.

Relaxin

Relaxin, ein in den Ovarien gebildetes Peptidhormon, erhöhte den cAMP- und cGMP-Gehalt der IZ. Eine Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp ist im Moment noch nicht möglich. Die Werte sind aber insofern von Interesse, als auch in menschlicher Magenschleimhaut Relaxin-Rezeptoren über die Aktivierung einer AC wahrscheinlich gemacht wurden und in der Rattenmagenschleimhaut sogar Relaxin-immunoreaktives Material nachgewiesen werden konnte (281). Eine Stimulation des cAMP-Gehaltes durch Relaxin wurde auch im Uterus (70,71,290,291) und in der Symphyse (45,46) beobachtet, während der cGMP-Spiegel im Uterus nicht beeinflußt wurde (290,291).

Proglumid

Proglumid, in isolierten Kaninchenmagenzellen (210) sowie in der Rattenmagenschleimhaut (377) angeblich als Gastrin-Antagonist wirksam und im Handel als Ulkustherapeutikum erhältlich, hatte keinen Einfluß auf den basalen cAMP- und cGMP-Spiegel der IZ.

Carbenoxolon

Auch Carbenoxolon, ein weiteres Ulkustherapeutikum (16), hatte keinen Einfluß auf die basalen Spiegel der cyclischen Nukleotide. Dagegen führte die strukturanaloge Glycyrrhetinsäure, wahrscheinlich über eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase, zu einer Erhöhung des cAMP-Gehaltes der Rattenmagenschleimhaut bei in vivo Applikation. Der cGMP-Spiegel wurde in dieser Arbeit trotz einer Hemmung der cGMP-Phosphodiesterase nicht erhöht (2,4).

Hydrocortison

Glucocorticoide wirken in vivo bei pharmakologischer Dosierung ulcerogen (158), ohne eine direkte Wirkung auf die Säuresekretion zu haben. Ein permissiver Effekt auf die Wirkung anderer Stimulantien ist aber nicht auszuschließen (85,95).

Hydrocortison erhöhte den cAMP- und den cGMP-Spiegel der IZ. Im Unterschied hierzu hatten Glucocorticoide bei Langzeitanwendung in vivo keine (95,97,271) oder - in höherer Dosierung - eine hemmende Wirkung (117) auf die cyclischen Nukleotidspiegel der Rattenmagenschleimhaut. Eine permissive Wirkung auf die Stimulation des cAMP-Spiegels durch andere Substanzen erschien jedoch möglich (95,97). Im Gewebe des Meerschweinchenmagens führten Glucocorticoide zu einer Zunahme der basalen AC-Aktivität und zu einer Verstärkung des Histamin-Effektes (5). Auch bei den Glucocorticoiden, die als Steroide die Zellmembran leicht durchdringen und über einen Cytosolrezeptor, d.h ohne direkte Einbeziehung des cAMP-Systems, wirken (30), spielt möglicherweise ein indirekter Mechanismus eine Rolle. So wäre z.B. die Freisetzung parakrin wirksamer Substanzen oder die Verstärkung der Wirkung endogener Aktivatoren des cAMP-Systems [wie dies unter anderem für die Interaktion mit ß-sympathomimetischen Substanzen im Fettgewebe beschrieben wurde (158)] möglich.

Kalium

Kaliumchlorid 100mmol/l hatte keine Wirkung auf den cAMP-Spiegel der intakten Zellen. Eine AC aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens konnte aber durch Kalium stimuliert werden (243,373), wobei die unterschiedlichen Bedingungen in diesem zellfreien System sicherlich eine Rolle spielen. Auch das zelluläre cGMP wurde nicht beeinflußt, obwohl Kalium in anderen Geweben als Stimulans wirksam war (82,93).

Kalium ist für die Säureproduktion der PZ unerläßlich. Ohne dieses Kation ist eine Funktion der "Protonenpumpe" (K^+/H^+-ATPase) nicht möglich. Die eigen Ergebnisse bestätigen die Auffassung, daß Kalium, ohne Beteiligung des cAMP-Systems und distal zu diesem, direkt an der Säureproduktion beteiligt ist (286).

Literatur: Wirkungen von Kalium in der Korpus-Magenschleimhaut

Säureproduktion: - Stimulation → Kaninchen: ID (79,120,121,160,189, 284,285,381)

Sauerstoffverbrauch: - Stimulation → Kaninchen: ID (160)

H.18 Schlußfolgerungen

I. Cyclische Nukleotide und Säuresekretion

1. Die eigenen Ergebnisse stützen die Theorie einer Beteiligung von cAMP an der histaminergen Säuresekretion (369):
a) Histamin stimulierte den cAMP-Spiegel der IZ und dieser Effekt war in PZ lokalisiert.
b) Bekannte Inhibitoren der histaminergen Säuresekretion - Cimetidin, PGE_2, Somatostatin, Adrenalin - waren in der Lage auch diesen Effekt zu hemmen.
c) Forskolin, das die histaminerge Säureproduktion zu potenzieren vermag, verstärkte zugleich den Histamin-Effekt auf den cAMP-Spiegel.

2. Die erhaltenen Daten bestätigen die Auffassung, daß die cholinerge und gastrinerge Säuresekretion nicht über cAMP vermittelt wird (369). Zwar stimulierten sowohl Carbachol als auch Pentagastrin den cAMP-Spiegel, jedoch war dieser Effekt nicht in PZ lokalisiert.

3. Die postulierte Beteiligung von cGMP an der Regulation der Säuresekretion (4,375) erscheint aufgrund der eigenen Messwerte als sehr unwahrscheinlich. Zwar wurde der cGMP-Spiegel durch Histamin und Carbachol stimuliert, jedoch war dieser Effekt in Nicht-PZ lokalisiert. Pentagastrin hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf das zelluläre cGMP.

II. Cyclische Nukleotide und Pepsinsekretion

1. Die eigenen Befunde sprechen für das Konzept einer Beteiligung von cAMP (187) an der durch ß-Sympathomimetika, Pentagastrin, Pankreozymin und Forskolin stimulierten Pepsinsekretion, da diese Substanzen zu einer Stimulation des cAMP-Spiegels in Nicht-PZ führten.

2. Eine Funktion von cGMP in der cholinergen und adrenergen Pepsinsekretion erscheint aufgrund der mit diesen Substanzen erhaltenen Stimulation in Nicht-PZ prinzipiell nicht ausgeschlossen, ist jedoch wegen der fehlenden Wirkung von Dibutyryl-cGMP auf die Pepsinsekretion (184) ziemlich unwahrscheinlich. Die eigenen Daten ergeben keinen Anhaltspunkt für eine Mitwirkung von cGMP an der Gastrin- und Pankreozymin-induzierten Pepsinsekretion.

III. Cyclische Nukleotide und andere physiologische Leistungen der Magenschleimhaut

1. Eine Beteiligung von cGMP an der durch Cholinergika und Prostaglandine stimulierten Alkali- und Schleimsekretion des Magens erscheint aufgrund der in Nicht-PZ lokalisierten Stimulation des cGMP-Spiegels durch diese Substanzen und aufgrund der mit Dibutyryl-cGMP erhaltenen Ergebnisse (125) als möglich. In Einklang hiermit steht auch die beobachtete Erhöhung des zellulären cGMPs durch das die Magenschleimsekretion-stimulierende Ethanol.

2. Eine Mitwirkung von cAMP an der durch ß-Sympathomimetika stimulierten Intrinsic-Faktor-Sekretion (296,297,298) ist denkbar.

3. Auch eine Beteiligung von cGMP an der "cytoprotectiven" Wirkung von Thiolen und PGE_2 kommt aufgrund der durch diese Substanzen ausgelösten Erhöhung des cGMP-Spiegels möglicherweise in Frage.

4. Eine Zuordnung der stimulierenden Effekte von Trijodthyronin (cAMP), Calcitonin (cAMP), Dopamin (cAMP), Hydrocortison (cAMP und cGMP) und Relaxin (cAMP und cGMP) zu bestimmten sekretorischen Leistungen der Magenschleimhaut erscheint noch nicht möglich. Da diese Substanzen jedoch physiologischerweise im Blutplasma bzw in der Magenschleimhaut vorkommen, sollten die erhaltenen Daten Anlaß geben, diese Stoffe einer eingehenderen Untersuchung bezüglich möglicher Wirkungen an der Magenschleimhaut zu unterziehen.

5. Dies gilt auch für die Gruppe der potentiel NO-bildenden Stoffe, die mit ihrer starken stimulierenden Wirkung auf den cGMP-Spiegel als Testsubstanzen für die durch dieses cyclische Nukleotid am Magen auslösbaren Wirkungen dienen könnten.

I Zusammenfassung

I.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es ein geeignetes radioimmunologisches cAMP- und cGMP-Messystem aufzubauen, um in isolierten Zellen aus der Magenschleimhaut der Ratte die pharmakologische Beeinflussung des cGMP-Spiegels zu untersuchen und die Kenntnisse über die Regulation des cAMP-Spiegels zu vertiefen. Das System der cyclischen Nukleotide in der Magenschleimhaut sollte aus physiologischer und pharmakologischer Sicht besser charakterisiert werden.

I.2 Praktischer Teil

Methodik: Durch Immunisierung von Kaninchen mit ScAMP- bzw ScGMP-Humanserumalbumin-Konjugat wurden Antisera erhalten, deren Eigenschaften (Affinität, Spezifität, Empfindlichkeit) gut mit Literaturangaben übereinstimmten. Durch Einfügung eines einfach durchführbaren Reinigungsschrittes mit Aluminiumoxid im "Batch"-Verfahren gelang es die von Delaage et al (91) entwickelte RIA-Methodik den Erfordernissen der experimentellen Arbeit mit isolierten Magenschleimhautzellen anzupassen. Die Zellen wurden nach der Methode von Lewin et al (201) isoliert und nach Sonnenberg et al (342) in Zellfraktionen unterschiedlichen Parietalzell-Gehaltes aufgetrennt.

Versuche mit isolierten Zellen: Der basale cAMP-Spiegel betrug 377 ± 91- , der basale cGMP-Spiegel 7,38 ± 2,49 fmol/10^6 Zellen.
1. Phosphodiesterase-Hemmstoffe (IBMX, Theophyllin) erhöhten die Spiegel beider cyclischer Nukleotide konzentrations- und zeitabhängig.
2. Histamin erhöhte den cAMP-Spiegel [Effekt in Parietalzellen (= PZ) lokalisiert; Hemmung durch Cimetidin, Adrenalin, PGE_2, Trijodthyronin, Somatostatin, Ethanol und Dopamin; Verstärkung durch Forskolin; keine signifikante Beeinflussung durch Mepyramin und Glucagon] und den cGMP-Spiegel (vorwiegend in Nicht-PZ; Hemmung durch Cimetidin, kein signifikanter Einfluß von Mepyramin).
3. Cholinerge Substanzen (Carbachol, Pilocarpin, Acetylcholin) erhöhten den cAMP-Spiegel (nur im Zellgemisch; Hemmung durch Atropin) und den cGMP-Spiegel (vorwiegend in Nicht-PZ; Effekt konzentrations- und zeitabhängig).

4. Pentagastrin erhöhte das zelluläre cAMP (vorwiegend in Nicht-PZ; Effekt nur nach 5-, aber nicht nach 30min) ohne den cGMP-Spiegel zu beeinflussen.
5. Sympathomimetika stimulierten den cAMP-Spiegel (vorwiegend in Nicht-PZ) über einen ß-adrenergen Mechanismus (Adrenalin und Hexoprenalin potenter und effizienter als Noradrenalin, Phenylephrin und Naphazolin; Effekt durch Propranolol hemmbar, Phentholamin ohne oder mit nur geringer Wirkung) und den cGMP-Spiegel (vorwiegend in Nicht-PZ) über einen rezeptorunabhängigen Mechanismus (Effekt weder durch Propranolol noch durch Phentholamin hemmbar, Stimulation auch durch Ephedrin).
6. Thiole (DTT, L-Cystein, 2-Mercaptoethanol) und potentiel NO-bildende Substanzen führten zu einer starken Erhöhung des zellulären cGMP-Gehaltes.
7. PGE_2, Trijodthyronin, Calcitonin, Pankreozymin, Dopamin, Serotonin, Aminopyrin und Forskolin führten zu einer Stimulation des cAMP-, Ethanol zu einer Erhöhung des cGMP- und Relaxin und Hydrocortison zu einer Stimulation des cAMP- und cGMP-Spiegels. Keinen Einfluß auf die Spiegel der cyclischen Nukleotide hatten $PGF_{2\alpha}$, Arachidonsäure, Indometacin, Acetylsalicylsäure, Insulin, Glucagon, Carbenoxolon, Proglumid, Adrenochrom und Kalium.

I.3 Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse stützen das Konzept einer Beteiligung von cAMP an der histaminergen Säureproduktion, der adrenerg-, gastrinerg- und Pankreozymin-stimulierten Pepsinsekretion und der adrenergen Intrinsic-Faktor-Sekretion. Eine Beteiligung von cGMP an der Säureproduktion erscheint als sehr unwahrscheinlich. Auch eine Mitwirkung an der Pepsinsekretion ist nicht anzunehmen. Dagegen wäre eine Transmitter-Funktion des cGMP in der Alkali- und Schleimproduktion der Magenschleimhaut sowie bei der "cytoprotectiven" Wirkung verschiedener Substanzen denkbar. Die Beeinflussung der cyclischen Nukleotide durch einige in der Magenschleimhaut bis jetzt nur wenig untersuchte Substanzen (z.B. Thiole, potentielle NO-Bildner, Hydrocortison, Trijodthyronin) sollte Anlaß geben, die Wirkungen dieser Stoffe am Magen näher zu charakterisieren.

K Literaturverzeichnis

1. Allen, A.: Structure and function of gastrointestinal mucus in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 617-39; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

2. Amer, M.S., McKinney, G.R., Akcasu, A.: Effect of glycyrrhetinic acid on the cyclic nucleotide system of the rat stomach Biochem. Pharmacol. 23,3085-92 (1974)

3. Amer, M.S., McKinney, G.R.: Studies with cholecystokinin in vitro. IV. Effects of cholecystokinin and related peptides on phosphodiesterase
J. Pharm. Exp. Ther. 183,535-48 (1972)

4. Amer, M.S.: Cyclic GMP and gastric acid secretion
Am. J. Dig. Dis. 19,71-4 (1974)

5. Anttila, P., Lücke, C., Westermann, E.: Characterization of adenylate cyclase in a broken cell preparation of guinea pig gastric mucosa and effects of corticosteroids
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293,R33 (1976)

6. Anttila, P., Lücke, C., Westermann, E.: Stimulation of adenylate cyclase of guinea pig gastric mucosa by histamine, sodium fluoride and 5'-guanylimidodiphosphate and inhibition by histamine H_1- and H_2-receptor antagonists in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296,31-6 (1976)

7. Appleman, M.M., Thompson, W.J., Russell, T.R.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 3, Seite 65-98; Hrsg: Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1973)

8. Asakawa, T., Russell, T.R., Ho, R-J.: Purification and succinylation of cyclic GMP from large volume samples and radioimmunoassay of succinyl cyclic GMP
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68,682-90 (1976)

9. Ashmann, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M., Price, T.D.: Isolation of adenosine 3',5'- monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine
Biochem. Biophys. Res. Commun. 11,330-4 (1963)

10. Ayers, J.A., Simay, D.A., Saik, R.P.: Guanylate cyclase activity in frog gastric mucosa
J. Surg. Res. 29,546-51 (1980)

11. Bagnara, A.S., Finch, L.R.: Quantitative extraction and estimation of intracellular nucleoside triphosphates of Escherichia coli
Anal. Biochem. 45,24-34 (1972)

12. Bali, J.P., Soumarmon, A., Lewin, M., Bonfils, S.: A gastrin sensitive adenylate cyclase system in rat gastric mucosa
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 401-2; Hrsg: Bonfils et al; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

13. Balint, G.A., Varro, V.: On the cytoprotective action of sulfhydryl-containing substances
Acta Physiol. Acad. Scien. Hung. 60,139-42 (1982)

14. Barden, N., Dupont, A., Cote, J.-P.: Pentagastrin and adenosine 3',5'- cyclic monophosphate stimulated secretion of somatostatin from perfused rat gastric mucosa
Life Sciences 24,739-42 (1979)

15. Barret, P., Rasmussen, H.: Parathyroid hormone, bone and cyclic AMP
in: Handbook of Experimental Pharmacology 58/2, Seite 599-622; Hrsg: Kebabian, J.W., Nathanson, J.A.; Springer Verlag, Berlin (1982)

16. Bass, P.: Gastric antisecretory and antiulcer agents
Adv. Drug Res. 8,205-328 (1974)

17. Bataille, D., Gespach, C., Coudray, A.M., Rosselin, G.: "Enteroglucagon": A specific effect on gastric glands isolated from the rat fundus. Evidence for an "oxyntomodulin" action
Bioscience Reports 1,151-5 (1981)

18. Bataille, D., Gespach, C., Tatemoto, K., Marie, J.C., Coudray, A.M., Rosselin, G., Mutt, V.: Bioactive enteroglucagon (oxyntomodulin): Present knowledge on its chemical structure and its biological activities
Peptides 2 Suppl 2,41-4 (1981)

19. Batzri, S., Gardner, J.D.: Cellular cyclic AMP in dispersed mucosal cells from guinea pig stomach
Biochim. Biophys. Acta 541,181-9 (1978)

20. Batzri, S., Dyer, J.: Direct action of D-lysergic acid diethylamide on dispersed mucosal cells from guinea pig stomach
Biochem. Pharmacol. 31,2476-9 (1982)

21. Batzri, S.: Direct action of somatostatin on dispersed mucosal cells from guinea-pig stomach
Biochim. Biophys. Acta 677,521-4 (1981)

22. Batzri, S., Dyer, J.: Aminopyrine uptake by guinea pig gastric mucosal cells. Mediation by cyclic AMP and interactions among secretagogues
Biochim. Biophys. Acta 675,416-26 (1981)

23. Batzri, S., Harmon, J.W., Walker, M.D., Thompson, W.F., Toles, R.: Secretion of intrinsic factor from dispersed mucosal cells isolated from guinea pig and rabbit stomach
Biochim. Biophys. Acta 720,217-21 (1982)

24. Batzri, S.: Interaction of histamine with specific membrane receptors on gastric mucosal cells
Biochem. Pharmacol. 30,3013-6 (1981)

25. Batzri, S., Harmon, J.W., Thompson, W.F.: Interaction of histamine with gastric mucosal cells. Effect of histamine agonists on binding and biological response
Molecular Pharmacology 22,33-40 (1982)

26. Batzri, S., Harmon, J.W., Walker, M.D.: Identification of [^{3}H] histamine binding sites on gastric mucosal cells unrelated to histamine H_2-receptors
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108,965-9 (1982)

27. Batzri, S., Harmon, J.W., Dyer, J., Thompson, W.F.: Interaction of histamine with gastric mucosal cells. Effect of histamine H_2-antagonists on binding and biological response
Molecular Pharmacology 22,41-7 (1982)

28. Batzri, S., Gardner, J.D.: Action of histamine on cyclic AMP in guinea pig gastric cells: Inhibition by H_1- and H_2-receptor antagonists
Molecular Pharmacology 16,406-16 (1979)

29. Batzri, S., Gardner, J.D.: Potassium transport in dispersed mucosal cells from guinea pig stomach
Biochim. Biophys. Acta 508,328-38 (1978)

30. Baxter, J.D., Funder, J.W.: Hormone receptors
New Engl. J. Med. 301,1149-61 (1979)

31. Bearer, C.F., Chang, L.K., Rosenfeld, G.C., Thompson, W.J.: Histamine stimulation of rat gastric parietal cell adenylyl cyclase: Modulation by guanine nucleotides
Arch. Biochem. Biophys. 207,325-36 (1981)

32. Becker, M., Ruoff, H.-J.: Pentagastrin activation of adenylate cyclase in human gastric biopsy specimens
Experientia 35,781-2 (1979)

33. Becker, M., Miederer, S.E., Ruoff, H.-J.: Adenylate cyclase in gastric mucosal biopsies from patients with achlorhydria. Stimulation by PGE_2, histamine and gastrointestinal hormones
Pharmacology 27,211-8 (1983)

34. Becker, M., Ruoff, H.-J.: Inhibition by prostaglandin E_2, somatostatin and secretin of histamine-sensitive adenylate cyclase in human gastric mucosa
Digestion 23,194-200 (1982)

35. Berglindh, T., Sachs, G., Takeguchi, N.: Ca^{2+}-dependent secretagogue stimulation in isolated rabbit gastric glands
Am. J. Physiol. 239,G90-4 (1980)

36. Berglindh, T., Helander, H.F., Öbrink, K.J: Effects of secretagogues on oxygen consumption, aminopyrine accumulation and morphology in isolated gastric glands
Acta Physiol. Scand. 97,401-14 (1976)

37. Berglindh, T.: Effects of common inhibitors of gastric acid secretion on secretagogue-induced respiration and aminopyrine accumulation in isolated gastric glands
Biochim. Biophys. Acta 464,217-33 (1977)

38. Berglindh, T.: Potentiation by carbachol and aminophylline of histamine- and dB-cAMP-induced parietal cell activity in isolated gastric glands
Acta Physiol. Scand. 99,75-84 (1977)

39. Berglindh, T.: Isolated gastric glands and their response to cholinergic stimulation
in: First International Symposium on Hormonal receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 389-94; Hrsg: Bonfils et al; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

40. Berglindh, T., Sachs, G.: 3-isobutyl-1-methylxanthine will normalize the response to gastrin and acetylcholine in isolated gastric glands - Abstract
Fed. Proc. 39,376 (1980)

41. Berglindh, T., Öbrink, K.J.: A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa
Acta Physiol. Scand. 96,150-9 (1976)

42. Bersimbaev, R.I., Argutinskaya, S.V., Salganik, R.I.: The stimulating action of gastrin pentapeptide and histamine on adenyl cyclase activity in rat stomach
Experientia 27,1389-90 (1971)

43. Birnbaumer, L., Torres, H.N., Flawia, M.M., Fricke, R.F.: Improved methods for determination of guanylyl cyclase activity and synthesis of [α-^{32}P]GTP
Anal. Biochem. 93,124-33 (1979)

44. Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M.: Definition and antagonism of histamine H_2-receptors
Nature 236,385-90 (1972)

45. Braddon, S.A.: Relaxin dependent adenosine-3',5'- monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis
Endocrinology 102,1292-9 (1978)

46. Braddon, S.A.: The effects of relaxin on cyclic-AMP and ornithine decarboxylase levels in target tissues
Exp. Med. Biol. 143,255-72 (1982)

47. Braughler, J.M.: Sulfhydryl group involvement in the modulation of guanosine 3',5'-monophosphate metabolism by nitric oxide, norepinephrine, pyruvate and t-butyl hydroperoxide in minced rat lung
Biochem. Pharmacol. 312,3847-51 (1982)

48. Braughler, J.M., Mittal, C.K., Murad, F.: Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of guanylate cyclase
J. Biol. Chem. 254,12450-4 (1978)

49. Brennan, F.T., Arbaskov, D., Stefankiewicz, J.S., Groves, W.G.: Acid-secretory effects of pentagastrin, histamine, urecholine, dBcAMP, and cGMP in isolated stomachs of fed and fasted rats (38887)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149,725-30 (1975)

50. Brooker, G.: Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 10, Seite 1-33; Hrsg: Brooker, G., Greengard, P., Robison, A.; Raven Press, New York (1979)

51. Brooker, G., Terasaki, W.L., Price, M.G.: Gammaflow: A completely automated radioimmunoassay system
Science 194,270-6 (1976)

52. Brooker, G., Murad, F.: Automated "gamma-flo" radioimmunoassay of urinary cyclic AMP
Clin. Chem. 26,1738-40 (1980)

53. Burns, T.W., Langley, P.E., Terry, B.E., Bylund, D.B., Forte, L.R.: Alpha-2 adrenergic activation inhibits forskolin-stimulated adenylate cyclase activity and lipolysis in human adipocytes
Life Sciences 31,815-21 (1982)

54. Burnstock, G., Wong, H.: Systemic pharmacology of adrenergic agonists and antagonists: Effects on the digestive system
in: Handbook of Experimental Pharmacology 54/2, Seite 129-60; Hrsg: Szekeres, L.; Springer Verlag, Berlin (1981)

55. Butcher, R.W., Baird, C.E., Sutherland, E.W.: Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells
J. Biol. Chem. 243,1705-12 (1968)

56. Cailla, H.L., Cros, G.S., Jolu, E.J.P., Delaage, M.A., Depieds, R.C.: Comparison between rat and rabbit anticyclic AMP antibodies - specificity toward acyl derivatives of cyclic AMP
Anal. Biochem. 56,383-93 (1973)

57. Cailla, H.L., Vannier, C.J., Delaage, M.A.: Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate assay at 10^{-15}-mole level
Anal. Biochem. 70,195-202 (1976)

58. Cailla, H.L., Racine-Weisbuch, M.S., Delaage, M.A.: Adenosine 3',5' cyclic monophosphate assay at 10^{-15} mole level
Anal. Biochem. 56,394-407 (1973)

59. Cailla, H.L., Roux, D., Kuntziger, H., Delaage, M.A.: Antibodies against cyclic AMP, cyclic GMP and cyclic CMP. Their use in high performance radioimmunoassay
in: Hormones and Cell Regulation 4, Seite 1-25; Hrsg: Mumont, J., Nunez, J.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1980)

60. Cailla, H.L., Delaage, M.A.: Succinyl derivatives of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate: Synthesis and purification
Anal. Biochem. 48,62-72 (1972)

61. Canfield, S.P., Curwain, B.P., Price, C.: Acid secretion and mucosal cyclic nucleotide content of the guinea pig isolated stomach during bethanechol stimulation
Acta Hepato-Gastroenterol. 26,388-91 (1979)

62. Canfield, S.P., Curwain, B.P., Spencer, J.: Acid secretion and cyclic nucleotide content of the guinea pig isolated stomach in the presence of the ionophore A23187
Acta Hepato-Gastroenterol. 25,155-7 (1978)

63. Canfield, S.P., Curwain, B.P., Phillips, J., Price, C.: Acid secretion without changes in mucosal cyclic nucleotides in the guinea-pig stomach
J. Physiol. (London) 275,52P-53P (1978)

64. Canfield, S.P., Price, C.A.: A comparison of the effects of sympathomimetic agents on gastric acid secretion by the rat stomach in vivo and in vitro
J. Physiol. 316,11-21 (1981)

65. Canfield, S.P., Hughes, A.D., Price, C.A., Spencer, J.E.: The action of ß-adrenoceptor agonists on acid secretion by the rat isolated stomach
J. Physiol. 316,23-31 (1981)

66. Cazottes, C., de Saint Blanquat, G., Fritsch, P., Derache, R.: Effect of nitrites and nitrates on irrigation and secretion of gastric mucosa in rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 309,69-75 (1979)

67. Chan, P.S., Black, C.T., Williams, B.J.: Separation of cyclic 3',5'-AMP from ATP, ADP, and 5'-AMP by precipitation with inorganic compounds
Anal. Biochem. 55,16-25 (1973)

68. Chasin, M., Harris, D.N.: Inhibition and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 7. Seite 225-64; Hrsg: Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1976)

69. Chaudhury, T.K., Jacobson, E.D.: Prostaglandin cytoprotection of gastric mucosa
Gastroenterology 74,59-63 (1978)

70. Cheah, S.H., Sherwood, O.D.: Target tissues for relaxin in the rat: Tissue distribution of injected ^{125}I-labeled relaxin and tissue changes in adenosine 3',5'-monophosphate levels after in vitro relaxin incubation
Endocrinology 106,1203-9 (1980)

71. Cheah, S.H., Sherwood, O.D.: Target tissues for relaxin
Exp. Med. Biol. 143,327-37 (1982)

72. Cheret, A.M., Girodet, J., Lewin, M.: Stimulation of isolated rat parietal cell by gastrin
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 405; Hrsg: Bonfils et al; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

73. Cheung, L.Y.: Cyclic GMP response to histamine and pentagastrin stimulation of gastric acid secretion
Surg. Forum 30,339-40 (1979)

74. Cheung, L.Y, Newton, W.T.: Cyclic guanosine monophosphate response to acetylcholine stimulation of gastric alkaline secretion
Surgery 86,156-62 (1979)

75. Chew, C.S., Hersey, S.J., Sachs, G., Berglindh, T.: Histamine responsiveness of isolated gastric glands
Am. J. Physiol. 238,G312-20 (1980)

76. Chew, C.S., Hersey, S.J.: Dissociation between oxyntic cell cAMP formation and HCl secretion in bullfrog gastric mucosa
Am. J. Physiol. 235,E140-9 (1978)

77. Chew, C.S., Hersey, S.J.: Gastrin stimulation of isolated gastric glands
Am. J. Physiol. 242,G504-12 (1982)

78. Chew, C.S., Hersey, S.J.: Characteristics of histamine receptor in isolated gastric glands
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 361-72; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

79. Chew, C.S.: Inhibitory action of somatostatin on isolated gastric glands and parietal cells
Am. J. Physiol. 245,G221-9 (1983)

80. Chiba, T., Taminato, T., Kadowaki, S., Abe, H., Chihara, K., Seino, Y., Matsukara, S., Fujita, T.: Effects of glucagon, secretin and vasoactive intestinal polypeptide on gastric somatostatin and gastrin release from isolated perfused rat stomach
Endocrinology 79,67-71 (1980)

81. Christophe, J.P., Frandsen, E.K., Coulon, T.P., Krishna, G., Gardner, J.D.: Action of cholecystokinin, cholinergic agents, and A-23187 on accumulation of guanosine 3',5'-monophosphate in dispersed guinea pig pancreatic acinar cells
J. Biol. Chem. 251,4640-5 (1976)

82. Clyman, R.I., Blacksin, A.S., Sandler, J.A., Manganiello, V.C., Vaughan, M.: The role of calcium in regulation of cyclic nucleotide content in human umbilical artery
J. Biol. Chem. 250,4718-21 (1975)

83. Cohen, N., Mazure, P., Dreiling, D.A., Janowitz, H.D.: The effect of glucagon on histamine-stimulated gastric secretion in man
Gastroenterology 39,48-54 (1960)

84. Cooke, A.R., Chvasta, T.E., Granner, D.K.: Histamine, pentagastrin, methyl xanthines and adenyl cyclase activity in acid secretion (38414)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147,674-8 (1974)

85. Cooke, A.R., Preshaw, R.M., Grossman, M.J.: Effect of adrenalectomy and glucocorticoids on the secretion and adsorption of hydrogen ion
Gastroenterology 50,761-7 (1966)

86. Counis, R., Mongongu, S.: Adenylate cyclase assay with [α-^{32}P]-ATP as substrate
Anal. Biochem. 84,179-85 (1978)

87. Craven, P.A., De Rubertis, F.R.: Chromatographic separation of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate from guanylate cyclase reaction mixtures
Anal. Biochem. 72,455-9 (1976)

88. Croft, D.N., Inglefinger, F.J.: Isolated gastric parietal cells: Oxygen consumption, electrolyte content and intracellular pH
Clin. Sci. 37,491-501 (1969)

89. Darfler, F.J., Mahan, L.C., Koachman, A.M., Insel, P.A.: Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase
J. Biol. Chem. 257,11901-7 (1982)

90. Davison, J.S., Najafi-Farashah, A.: The effect of cyclic guanosine monophosphate, a competitive antagonist to cholecystokinin-pankreozymin, on gastric acid secretion in the isolated mouse stomach
Life Sciences 31,355-61 (1982)

91. Delaage, M.A., Roux, D., Cailla, H.L.: Recent advances in cyclic nucleotide radioimmunoassay
in: Molecular Biology and Pharmacology of Cyclic Nucleotides. Seite 155-70; Hrsg: Folco, G., Paoletti, R.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1978)

92. Dial, E., Thompson, W.J., Rosenfeld, G.C.: Isolated parietal cells: Histamine response and pharmacology
J. Pharm. Exp. Ther. 219,585-90 (1981)

93. Diamond, J., Janis, R.A.: Increases in cyclic GMP levels may not mediate relaxant effects of sodium nitroprusside, verapamil and hydralazine in rat vas deferens
Nature 271,472-3 (1978)

94. Dinnendahl, V.: A rapid and simple procedure for the determination of guanosine 3',5'-monophosphate by use of the protein-binding method
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284,55-61 (1974)

95. Domschke, W., Domschke, S., Classen, M., Demling, L.: Glucocorticoids and gastric secretion: The role of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
Gastroenterology 63,252-6 (1972)

96. Domschke, W., Domschke, S., Rösch, W., Classen, M., Demling, L.: Failure of pentagastrin to stimulate cyclic AMP accumulation in human gastric mucosa
Scand. J. Gastroent. 9,467-71 (1974)

97. Domschke, W., Domschke, S., Classen, M., Demling, L.: Cyclic 3',5'-AMP and gastric secretion in the rat: Effect of adrenalectomy and glucocorticoids
Horm. Metab. Res. 4,226-7 (1972)

98. Douglas, W.W.: Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists
in: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th Edition. Seite 609-46; Hrsg: Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman, A.: Macmillan, New York (1980)

99. Dousa, T.P., Hui, Y.S., Northrup, T.E.: Inhibition of histamine-sensitive adenylate-cyclase from the guinea pig gastric mucosa by nolinium bromide
Biochem. Pharmacol. 28, 343-4 (1979)

100. Dozois, R.R., Kim, J.K., Dousa, T.P.: Interaction of prostaglandins with canine gastric mucosal adenylate cyclase-cyclic AMP system
Am. J. Physiol. 235,E546-51 (1978)

101. Dozois, R.R., Wollin, A., Rettmann, R.D., Dousa, T.P.: Effect of histamine on gastric mucosal adenylate cyclase
Am. J. Physiol. 232,E35-8 (1977)

102. Dozois, R.R., Madson, T.H., Dousa, T.P.: Inhibition of histamine-sensitive adenylate cyclase from guinea pig fundic gastric mucosa by arachidonic acid and by an analog of prostaglandin endoperoxide PGH_2
Dig. Dis. Scie. 25,273-8 (1980)

103. Dozois, R.R, Dousa, T.P.: Interactions of prostaglandin E_2 and histamine with adenylate cyclase systems from canine gastric mucosa
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 411; Hrsg: Bonfils et al.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

104. Dozois, R.R., Dousa, T.P.: Interactions of prostaglandin E_2 (PGE_2) and its methylated analog with dog fundic gastric mucosa (FGM) adenylate cyclase (AC) - Abstract
Clin. Res. 25,309A (1977)

105. Dunwiddie, T.V., Hoffer, B.J.: The role of cyclic nucleotides in the nervous system
in: Handbook of Experimental Pharmacology 58/2, Seite 389-464; Hrsg: Kebabian, J.W., Nathanson, J.A.; Springer Verlag, Berlin (1982)

106. Dupont, C., Gespach, C., Chenut, B., Rosselin, G.: Regulation by vasoactive intestinal peptide of cyclic AMP accumulation in gastric epithelial glands
FEBS Letters 113,25-8 (1980)

107. Ecknauer, R., Dial, E., Thompson, W.J., Johnson, L.R., Rosenfeld, G.C: Isolated rat gastric parietal cells: Cholinergic response and pharmacology
Life Sciences 28,609-21 (1981)

108. Ecknauer, R., Thompson, W.J., Johnson, L.R., Rosenfeld, G.C.: Isolated parietal cells: [^{3}H]QNB binding to putative cholinergic receptors
Am. J. Physiol. 239,G204-9 (1980)

109. Eichhorn, J.H., Salzman, E.W., Silen, W.: Cyclic GMP response in vivo to cholinergic stimulation of gastric mucosa
Nature 248,238-9 (1974)

110. Eichhorn, J.H., Salzman, E.W., Silen, W.: Cyclic GMP in stimulated gastric mucosa
Surg. Forum 24,363-5 (1973)

111. Ekblad, E.B.M.: Histamine and cAMP as possible mediators of acetylcholine-induced acid secretion
Am. J. Physiol. 239,G255-60 (1980)

112. Emami, S., Gespach, C., Forgue-Lafitte, M.E., Broer, Y., Rosselin, G.: Histamine and VIP interactions with receptor-cyclic AMP systems in the human gastric cancer cell line HGT-1
Life Sciences 33,415-23 (1983)

113. Fain, J.N.: Regulation of lipid metabolism by cyclic nucleotides
in: Handbook of Experimental Pharmacology 58/2, Seite 91-150; Hrsg: Kebabian, J.W., Nathanson, J.A.; Springer Verlag, Berlin (1982)

114. Falbriard, J.G., Posternak, T., Sutherland, E.W.: Preparation of derivatives of adenosine 3',5'-phosphate
Biochim. Biophys. Acta 148,99-105 (1967)

115. Farber, D.B., Lolley, R.N.: Measurement of cyclic nucleotides in retina
in: Methods in Enzymology 81, Seite 551-6; Hrsg: Packer, L.; Academic Press, New York (1982)

116. Farmer, R.W., Harrington, C.A., Brown, D.H.: A simple radioimmunoassay for 3',5', cyclic adenosine monophosphate
Anal. Biochem. 64,455-60 (1975)

117. Fedchenko, S.N.: Ultrasructural localization of adenylate cyclase and guanylate cyclase activity in the rat gastric glandulocytes under hormonal disbalance
Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 81,87-92 (1981)

118. Fellenius, E., Elander, B., Wallmark, B., Haglund, U., Olbe, L., Helander, H.: Studies on acid secretory mechanism and drug action in isolated gastric glands from man
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 355-60; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

119. Fellenius, E., Elander, B., Wallmark, B., Haglund, U., Hellander, H.F., Olbe, L.: A micro-method for the study of acid secretory function in isolated human oxyntic glands from gastroscopic biopsies
Clin. Science 64,423-31 (1983)

120. Fellenius, E., Berglindh, T., Sachs, G., Olbe, L., Elander, B., Sjöstrand, S.-E., Wallmark, B.: Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking $(H^+ + K^+)$ATPase
Nature 290,159-61 (1981)

121. Fellenius, E., Elander, B., Wallmark, B., Helander, H.F., Berglindh, T.: Inhibition of acid secretion in isolated gastric glands by substituted benzimidazoles
Am. J. Physiol. 243,G505-10 (1982)

122. Ferrendelli, J.A., Rubin, E.H., Orr, H.T., Kinscherf, D.A., Lowry, O.H.: Measurement of cyclic nucleotides in histologically defined samples of brain and retina
Anal. Biochem. 78,252-9 (1977)

123. Flemström, G.: Active alkalinization by amphibian gastric fundic mucosa in vitro
Am. J. Physiol. 233,E1-12 (1977)

124. Flemström, G.: Gastric secretion of bicarbonate
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 603-16; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

125. Flemström, G., Garner, A.: Gastroduodenal HCO_3^- transport: characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection
Am. J. Physiol. 242,G183-93 (1982)

126. Flouret, G., Hechter, O.: Adsorption chromatography of cyclic nucleotides on silica gel and aluminia thin-layer sheets
Anal. Biochem. 58,276-85 (1974)

127. Flower, R.J., Moncada, S., Vane, J.R.: Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents; drugs employed in the treatment of gout
in: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th Edition, Seite 682-728; Hrsg: Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman, A.; Macmillan, New York (1980)

128. Frandsen, E.K., Krishna, G.: A simple ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissues
Life Sciences 18,529-41 (1976)

129. Freund's (complete) adjuvant 20 pack - Beipackzettel
Calbiochem-Behring Corp. (1971)

130. Frey, W.H., Senogles, S.E., Tuason, V.B., Nicol, S.E.: Stimulation of guanylate cyclase by EDTA and other chelating agents
Biochim. Biophys. Acta 658,369-76 (1981)

131. Fromm, D.: Gastric mucosal barrier
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 733-48; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

132. Garber, A., Heylings, J.R.: Stimulation of alkaline secretion in amphibian isolated gastric mucosa by 16,16-dimethyl PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$. A proposed explanation for some of the cytoprotective actions of prostaglandins
Gastroenterology 76,497-503 (1979)

133. Garbers, D.L., Murad, F.: Guanylate cyclase methods
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 10, Seite 57-67; Hrsg: Brooker, G., Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1979)

134. Gespach, C., Bataille, D., Dupont, C., Rosselin, G., Wünsch, E., Jaeger, E.: Evidence for a cyclic AMP system highly sensitive to secretin in gastric glands isolated from the rat fundus and antrum
Biochim. Biophys. Acta 630,433-41 (1980)

135. Gespach, C., Dupont, C., Bataille, D., Rosselin, G.: Selective inhibition by somatostatin of cyclic AMP production in rat gastric glands
FEBS Letters 114,247-52 (1980)

136. Gespach, C., Bouhours, D., Bouhours, J.-F., Rosselin, G.: Histamine interaction on surface recognition sites of H_2-type in parietal and non-parietal cells isolated from the guinea pig stomach
FEBS Letters 149,85-90 (1982)

137. Gespach, C., Hui Bon Hoa, D., Rosselin, G.: Regulation by vasoactive intestinal peptide, histamine, somatostatin-14 and -28 of cyclic adenosine monophosphate levels in gastric glands isolated from the guinea pig fundus or antrum
Endocrinology 112,1597-606 (1983)

138. Gespach, C., Dupont, C., Rosselin, G.: Action of histamine and vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP in gastric glands isolated from human fetal stomach
Experientia 37,866-7 (1981)

139. Gespach, C., Bataille, D., Dutrillaux, M.-C., Rosselin, G.: The interaction of glucagon, gastric inhibitory peptide and somatostatin with cyclic AMP production systems present in rat gastric glands
Biochim. Biophys. Acta 720,7-16 (1982)

140. Gespach, C., Bataille, D., Vauclin, N., Rosselin, G., Moroder, L., Wünsch, E.: Secretin binding sites coupled with adenylate cyclase in rat fundic membranes
Peptides 2Suppl2,247-51 (1981)

141. Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine 3',5'cyclic monophosphate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67,305-12 (1970)

142. Glass, D.B., Frey, W., Carr, D.W., Goldberg, N.D.: Stimulation of human platelet guanylate cyclase by fatty acids
J. Biol. Chem. 252,1279-85 (1977)

143. Glick, D.M.: Stimulated chloride transport by isolated parietal cells
Biochem. Pharmacol. 23,3283-8 (1974)

144. Glover, W.E.: Effect of dithiothreitol on histamine receptors in rabbit colon and guinea-pig ileum
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 6,151-7 (1979)

145. Goldberg, N.D., O'Dea, R.F., Haddox, M.K.: Cyclic GMP
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 3, Seite 155-223; Hrsg: Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1973)

146. Goldberg, M.L.: Radioimmunoassay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in human blood, urine, and cerebrospinal fluid
Clin. Chem. 23,576-80 (1977)

147. Goldberg, N.D., O'Toole, A.G.: Analysis of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate
Methods of Biochemical Analysis 20,1-39 (1971)

148. Graff, G., Stephenson, J.H., Winget, R.R., Goldberg, N.D.: Oxidative activation of guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides
Lipids 14,212-28 (1979)

149. Griessen, M.: Effect of Ca^{2+}, Mg^{2+}, NaN_3, cholinergic agents, and gastrointestinal hormones on the guanylate cyclase from guinea pig gastric mucosa
Gastroenterology 74,263-70 (1978)

150. Haddox, M.K., Stephenson, J.H., Moser, M.E., Goldberg, N.D.: Oxidative-reductive modulation of guinea pig splenic cell guanylate cyclase activity
J. Biol. Chem. 253,3143-52 (1978)

151. Haglund, U., Elander, B., Fellenius, E., Leth, R., Rehnberg, O., Olbe, L.: The effect of secretagogues on isolated human gastric glands
Scand. J. Gastroent. 17,455-60 (1982)

152. Harada, M., Maeno, H.: Effect of guanine nucleotides on histamine sensitive adenylate cyclase from the parietal cells of guinea pig
Arch. Biochem. Biophys. 213,405-13 (1982)

153. Hardman, J.G., Sutherland, E.W.: Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate
J. Biol. Chem. 244,6363-70 (1969)

154. Harper, J.F., Brooker, G.: Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'O acetylation by acetic anhydride in aqueous solution
J. Cycl. Nucl. Res. 1,207-18 (1975)

155. Harris, J.B., Alonso, D.: Stimulation of the gastric mucosa by adenosine-3',5'-monophosphate
Fed. Proc. 24,1368-76 (1965)

156. Harty, R.F., McGuigan, J.E.: Effects of cyclic adenosine and cyclic guanosine nucleotides and theophylline on gastrin synthesis and secretion in rat antral organ culture
Pharmacology 24,35-44 (1982)

157. Haynes, R.C., Murad, F.: Agents affecting calcification: Calcium, parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D, and other compounds
in: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th Edition, Seite 1524-50; Hrsg: Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman, A.; Macmillan, New York (1980)

158. Haynes, R.C., Murad, F.: Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of adrenocortical steroid biosynthesis
in: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th Edition, Seite 1466-96: Hrsg: Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman, A.; Macmillan, New York (1980)

159. Hepp, K.D.: Studies on the mechanism of insulin action: basic concepts and clinical implications
Diabetologia 13,177-86 (1977)

160. Hersey, S.J., Chew, C.S., Campbell, L., Hopkins, E.: Mechanism of action of SCN in isolated gastric glands
Am. J. Physiol. 240,G232-8 (1981)

161. Hersey, S.J., Owirodu, A., Miller, M.: Forskolin stimulation of acid and pepsinogen secretion by gastric glands
Biochim. Biophys. Acta 755,293-9 (1983)

162. Hersey, S.J.: ATP metabolism in isolated gastric glands
Ann. N. Y. Acad. Sci. 341,274-82 (1980)

163. Hersey, S.J., Miller, M., Owirodu, A.: Role of glucose metabolism in acid formation by isolated gastric glands
Biochim. Biophys. Acta 714,143-51 (1982)

164. Hersey, S.J., May, D., Schyberg, D.: Stimulation of pepsinogen release from isolated gastric glands by cholecystokininlike peptides
Am. J. Physiol. 244,G192-7 (1983)

165. Hersey, S.J. Miller, M., Norris, S.H.: Forskolin: A new biochemical tool for studying gastric secretion
Progress in Clinical and Biological Research 126,329-41 (1983)

166. Hökfelt, T., Efendic, S., Hellerström, C., Johansson, O., Luft, R., Arimura, A.: Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A_1-cells of the pancreatic islands and to the hypothalamus
Acta Endocrin. (Kbh) 80 Suppl 200,1-41 (1975)

167. Holian, O., Nyhus, L.M., Bombeck, C.T.: The effect of pentagastrin on adenyl cyclase - Abstract
Gastroenterology 64,746 (1973)

168. Holst, J.J.: Extrapancreatic glucagons
Digestion 17,168-90 (1978)

169. Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J., Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue
Biochem. Med. 18,257-73 (1977)

170. Hotz, J., Goebell, H., Ziegler, R.: The role of calcium in gastric acid and pepsin secretion
in: Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract, Seite 159-72; Hrsg: Case, R.M., Goebell, H.; MTP Press, St. Leonards House (1976)

171. Humes, J.L., Rounbehler, M., Kuehl, F.A.: A new assay for measuring adenyl cyclase activity in intact cells
Anal. Biochem. 32,210-7 (1969)

172. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature 194,495 (1962)

173. Ishikawa, E., Ishikawa, S., Davis, J.W., Sutherland, E.W.: Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine
J. Biol. Chem. 244,6371-6 (1969)

174. Jackson, R.J., Sachs, G.: Identification of gastric cyclic AMP binding proteins
Biochim. Biophys. Acta 717,453-8 (1982)

175. Jacobson, E.D., Thompson, W.J.: Cyclic AMP and gastric secretion: The illusive second messenger
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 7, Seite 199-224; Hrsg: Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1976)

176. Johansson, C., Kollberg, B.: Stimulation by intragastrically adminstered E_2 prostaglandins of human gastric mucus output
Eur. J. Clin. Invest. 9,229-32 (1979)

177. Johansson, C., Bergström, S.: Prostaglandins and protection of the gastroduodenal mucosa
Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 77,21-47 (1982)

178. Johnson, L.R., Takeuchi, K., Speir, G.R.: Mucosal gastrin receptor
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 401-12; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

179. Johnson, L.R.: Histamine and gastric secretion
in: Handbook of Experimental Pharmacology XVIII/2, Seite 41-56; Hrsg: e Silva, M.R.; Springer Verlag, Berlin (1978)

180. Jorpes, J.E., Mutt, V.: Secretin and cholecystokinin
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXIV, Seite 1-179; Hrsg: Jorpes, J.E., Mutt, V.; Springer Verlag, Berlin (1973)

181. Kapadia, C.R., Schafer, D.E., Donaldson, R.M., Ebersole, E.R.: Evidence for involvement of cyclic nucleotides in intrinsic factor secretion by isolated rabbit gastric mucosa
J. Clin. Invest. 64,1044-9 (1979)

182. Karppanen, H.O., Westermann, E.: Increased production of cyclic AMP in gastric tissue by stimulation of histamine$_2$ (H_2)-receptors
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279,83-7 (1973)

183. Karppanen, H., Puurunen, J., Kairaluoma, M., Larmi, T.: Effects of ethyl alcohol on the adenosine 3',5'-monophosphate system of the human gastric mucosa
Scand. J. Gastroenterol. 11,603-7 (1976)

184. Kasbekar, D.K., Jensen, R.T., Gardner, J.D.: Pepsinogen secretion from dispersed glands from rabbit stomach
Am. J. Physiol. 244,G392-6 (1983)

185. Kimura, H., Thomas, E., Murad, F.: Effects of decapitation, ether and pentobarbital on guanosine 3',5'-phosphate and adenosine 3',5'-phosphate levels in rat tissues
Biochim. Biophys. Acta 343,519-28 (1974)

186. Klotz, U., Antonin, K.H., Bieck, P.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases of human and rat gastric mucosa
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296,187-90 (1977)

187. Koelz, H.R., Hersey, S.J., Sachs, G., Chew, C.S.: Pepsinogen release from isolated gastric glands
Am. J. Physiol. 243,G218-25 (1982)

188. Koelz, H.R., Fischer, J.A., Sachs, G., Blum, A.L.: Specific effect of acetylsalicylic acid on cation transport of isolated gastric mucosal cells
Am. J. Physiol. 235,E16-21 (1978)

189. Koelz, H.R., Sachs, G., Berglindh, T.: Cation effects on acid secretion in rabbit gastric glands
Am. J. Physiol. 241,G431-42 (1981)

190. Konturek, S.J.: Somatostatin and the gastrointestinal secretions
Scand. J. Gastroent. 11,1-4 (1976)

191. Kosterlitz, H.W.: Effects of choline esters on smooth muscle and secretions
in: Physiological Pharmacology 3, Seite 97-161; Hrsg: Root, W.S., Hofmann, F.G.; Academic Press, New York (1967)

192. Krause, E.-G., Wollenberger, A.: An improved protein binding assay for guanosine-3',5'-monophosphate using a binding protein from the pupa of the silkmoth, Bombyx mori L.
Acta Biol. Med. Germ. 35,543-52 (1976)

193. Lamprecht, S.A., Krawiec, J., Schwartz, B., Krugliak, P., Goldstein, J., Odes, H.S.: Prostaglandin E_1-stimulable cyclic AMP formation from rat gastric antral organ culture: Lack of effect on gastrin secretion
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108,186-92 (1982)

194. Larner, J., Lawrence, J.C., Roach, P.J., De Paoli-Roach, A.A., Walkenbach, R.J., Guinovart, J.: About insulin and glykogen
in: Cold Spring Harbor Symposium on Cell Proliferation, Seite 95-112; Cold Spring Harbor, N.Y. (1979)

195. Larsson, L.I., Holst, J.J., Hakanson, R., Sundler, P.: Distribution and properties of glucagon immunoreactivity in the digestive tract of various mammals: An immunohistochemical and immunochemical study
Histochemistry 44,281-90 (1975)

196. Larsson, L.I., Goltermann, N., De Magistris, L., Rehfeld, J.F., Schwartz, T.W.: Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion
Science 205,1393-5 (1979)

197. Levine, R.A., Kohen, K.R., Schwartzel, E.H., Ramsay, C.E.: Prostaglandin E_2-histamine interactions on cAMP, cGMP, and acid production in isolated fundic glands
Am. J. Physiol. 242,G21-6 (1982)

198. Levine, R.A., Schwartzel, E.H., Bachmann, S., Talev, J.N.: Effects of secretagogues and theophylline on canine gastric mucosal cyclic nucleotides
J. Lab. Clin. Med. 92,813-21 (1978)

199. Levine, R.A., Schwartzel, E.H., Randall, P.A., Bachman, S.: Failure of prostaglandins E_1 and E_2 to alter canine gastric mucosal cyclic nucleotides
Prostaglandins 18,63-72 (1979)

200. Levine, R.A., Schwartzel, E.H., Bachman, S., Talev, J.N.: Gastric cyclic nucleotide concentration in health and disease
Gastoenterology 73,737-45 (1977)

201. Lewin, M., Cheret, A.M., Soumarmon, A., Girodet,J.: Methode pour l'isolement et le tri des cellules de la muqueuse fundique de rat
Biol. Gastroenterol. 7,139-44 (1974)

202. Lewin, M., Grelac, F., Cheret, A.M., Rene, E., Bonfils, S.: Demonstration and characterization of histamine H_2-receptor on isolated guinea pig gastric cell
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 383-90; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

203. Lewin, M., Soumarmon, A., Bonfils, S.: Gastrin receptor sites in rat gastric mucosa
in: First International Symposium on Hormonal Recptors in Digestive Tract Physiology, Seite 379-87; Hrsg: Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

204. Lewin, M., Soumarmon, S., Bonfils, S.: Receptors for gastrin and histamine in gastric mucosa
Progress in Gastroenterology 18,203-40 (1977)

205. Lewin, M., Soumarmon, A., Bali, J.P., Bonfils, S., Girma, J.P., Morgat, J.L., Fromageot, P.: Interaction of ^{3}H-labelled synthetic human gastrin I with rat gastric plasma membranes. Evidence for the existence of biologically reactive gastrin receptor sites
FEBS Letters 66,168-72 (1976)

206. Liang, C.T., Sacktor, B.: The stimulation by catecholamines of guanylate cyclase activity in a cell-free system
J. Cycl. Nucl. Res. 4,97-111 (1978)

207. Ligumsky, M., Goto, Y., Debas, H., Yamada, T.: Prostaglandins mediate inhibition of gastric acid secretion by somatostatin in the rat
Science 219,301-3 (1983)

208. Lin, T.M., Evans, D.C., Spray, G.F., Benslay, D.N.: Action of glucagon on histamine-induced gastric acid secretion in dogs and rats
Arch. Int. Pharmacodyn. 188,332-40 (1970)

209. Lorber, S.H., Dinoso, V.P., Chey, W.Y.: Diseases of the gastrointestinal tract
in: The Biology of Alcoholism 3, Seite 339-57; Hrsg: Kissin, B., Begleiter, H.: Plenum Press, New York (1974)

210. Magous, R., Bali, J.-P.: High-affinity binding sites for gastrin on isolated rabbit gastric mucosal cells
Eur. J. Pharmacol. 82,47-54 (1982)

211. Maheshwari, R.K., Lad, P.M., Friedman, R.M.: Assays and procedures to study changes in cAMP concentrations after interferon treatment of cells
in: Methods in Enzymology 79, Seite 162-8; Hrsg: Pestka, S; Academic Press, New York (1981)

212. Main, I.H.M., Pearce, J.B.: Histamine output from the rat isolated gastric mucosa during acid secretion stimulated by pentagastrin, methacholine and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
Br. J. Pharm. 61,461P (1977)

213. Main, I.H.M., Pearce, J.B.: Effects of calcium on acid secretion from the rat isolated gastric mucosa during stimulation with histamine, pentagastrin, methacholine and dibutyryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
Br. J. Pharmacol. 64,359-68 (1978)

214. Main, I.H.M., Whittle, B.J.R.: The effects of E and A prostaglandins on gastric mucosal blood flow and acid secretion in the rat
Br. J. Pharmacol. 49,428-36 (1973)

215. Major, J.S., Scholes, P.: The localization of a histamine H_2-receptor adenylate cyclase system in canine parietal cells and its inhibition by prostaglandins
Agents and Actions 8,324-31 (1978)

216. Malbon, C.C., Moreno, F.J., Cabelli, R.J., Fain, J.N.: Fat cell adenylate cyclase and β-adrenergic receptors in altered thyroid states
J. Biol. Chem. 253,671-7 (1978)

217. Mangla, J.C., Kim, Y.M., Rubulis, A.A.: Adenyl cyclase stimulation by aspirin in rat gastric mucosa
Nature 250,61-2 (1974)

218. Mangeat, P., Marchis-Mouren, G., Cheret, A.M., Lewin, M.J.M.: Specific activation of cyclic AMP-dependent protein kinase(s) by H_2-histamine agonists in isolated gastric mucosal cells from guinea-pig
Biochim. Biophys. Acta 629,604-8 (1980)

219. Mangeat, P., Gespach, C., Marchis-Mouren, G., Rosselin, G.: Differential effects of histamine, vasoactive intestinal polypeptide, prostaglandin E_2 and somatostatin on cyclic AMP-dependent protein kinase activation in gastric glands isolated from the guinea pig fundus and antrum
Regulatory Peptides 3,155-68 (1982)

220. Mao, C.C., Jacobson, E.D., Shanbour, L.L.: Mucosal cyclic AMP and secretion in the dog stomach
Am. J. Physiol. 225,893-6 (1973)

221. Mao, C.C., Guidotti, A.: Simultaneous isolation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) in small tissue samples
Anal. Biochem. 59,63-8 (1974)

222. Maslinski, S., Ruoff, H.-J.: Potentiating action of hexoprenalin on ^{14}C-aminopyrine uptake by isolated rat parietal cells
Experientia 40,478-80 (1984)

223. Mattes, P., Raptis, S., Heil, T., Rasche, H., Scheck, R.: Extended somatostatin treatment of a patient with bleeding ulcer
Horm. Metab. Res. 7,508-11 (1975)

224. Matuoka, K., Mitsui, Y., Murota, S.-I.: Cytoprotective effect of cyclic AMP on cultured rabbit gastric cells
J. Pharm. Dyn. 5,911-5 (1982)

225. Michelangeli, F.: Effects of oligomycin on energy metabolism in isolated oxyntic cells
Biochem. Pharmacol. 28,941-3 (1979)

226. Mittal, C.K., Murad, F.: Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase
J. Cycl. Nucl. Res. 3,381-91 (1977)

227. Mittal, C.K., Murad, F.: Guanylate cyclase: Regulation of cyclic GMP metabolism
in: Handbook of Experimental Pharmacology 58/1, Seite 225-60; Hrsg: Nathanson, J.A., Kebabian, J.W.; Springer Verlag, Berlin (1982)

228. Mitznegg, P., Estler, C.-J., Loew, F.W., van Seil, J.: Effect of salicylates on cyclic AMP in isolated rat gastric mucosa
Acta Hepato-Gastroenterol. 24,372-6 (1977)

229. Murad, F., Arnold, W.A., Mittal, C.K., Braughler, J.M.: Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 11, Seite 175-204; Hrsg: Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1979)

230. Murad, F., Manganiello, V., Vaughan, M.: A simple, sensitive protein-binding assay for guanosine 3',5'-monophosphate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68,736-9 (1971)

231. Murad, F., Haynes, R.C.: Adenohypophyseal hormones and related substances
in: The Pharmacological Basis of Therapeutics 6th Edition, Seite 1369-96; Hrsg: Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman, A.; Macmillan, New York (1980)

232. Nafrady, J., Wollemann, M.: Direct stimulatory action of pentagastrin on the adenylate cyclase of rat stomach mucosa
Biochem. Pharmacol. 26,2083-5 (1977)

233. Nakajima, S., Hirschowitz, B.I., Sachs, G.: Studies on adenyl cyclase in Necturus gastric mucosa
Arch. Biochem. Biophys. 143,123-6 (1971)

234. Narumi, S., Maki, Y.: Possible role of cyclic AMP in gastric acid secretion in rat. Activation of carbonic anhydrase
Biochim. Biophys. Acta 311,90-7 (1973)

235. Nathanson, J.A., Kebabian, J.W.: Cyclic nucleotides Part I: Biochemistry
Handbook of Experimental Pharmacology 58/1; Springer Verlag, Berlin (1982)

236. Nathanson, J.A., Kebabian, J.W.: Cyclic nucleotides Part II: Physiology and pharmacology
Handbook of Experimental Pharmacology 58/2; Springer Verlag, Berlin (1982)

237. Numano, F., Yajima, M., Watanabe, Y., Moriya, K., Kuroiwa, T., Shimokado, T., Kishi, Y., Maezawa, H.: Microassay of cyclic nucleotides in vessel wall. V. Simultaneous assay of cyclic AMP and cyclic GMP
Exp. Mol. Path. 34,323-30 (1981)

238. Numano, F., Watanabe, Y., Takeno, K., Takano, T., Arita, M., Numano, F., Maezawa, H., Shimamoto, T., Adachi, K.: Microassay of cyclic nucleotides in vessel wall. I. Cyclic AMP
Exp. Mol. Path. 25,172-81 (1976)

239. Ohe, K., Shirakawa, T., Matsumoto, H., Miyoshi, A.: Cyclic nucleotide response to acid-secreting stimuli in guinea pig gastric mucosa in vitro
Gastroent. Jpn. 16,350-7 (1981)

240. Pairault, J., Laudat, P.: A simple method for routine determination of adenylate cyclase activity in intact fat cells
Anal. Biochem. 61,618-22 (1974)

241. Paulus, H.E., Whitehouse, M.W.: Nonsteroid anti-inflammatory agents
Annu. Rev. Pharmacol. 13,107-25 (1973)

242. Perez-Reyes, E., Payne, N.A., Gerber, J.G.: Effect of somatostatin, secretin, and glucagon on secretagogue stimulated aminopyrine uptake in isolated canine parietal cells
Agents and actions 13,265-8 (1983)

243. Perrier, C.V., Laster, L.: Adenyl cyclase activity of guinea pig gastric mucosa: Stimulation by histamine and prostaglandins
J. Clin. Invest. 49,73a (1970)

244. Petrin, A.: Wirkung von Calcitonin auf die Magen- und Pankreas-Sekretion
Dtsch. Med. Wochenschr. 99,2368-71 (1974)

245. Pharmacia Fine Chemicals Catalogue; Pharmacia Fine Chemicals AB, S-75104 Uppsala (Schweden) (1977)

246. Polgar, P., Vera, J.C., Kelley, R., Rutenburg, A.M.: Adenylate cyclase activity in normal and leukemic human leukocytes as determined by a radioimmunoassay for cyclic AMP
Biochim. Biophys. Acta 297,378-83 (1973)

247. Posternak, T., Sutherland, E.W., Henion, W.F.: Derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate
Biochim. Biophys. Acta 65,558-60 (1962)

248. Posternak, T., Weimann, G.: The preparation of acylated derivatives of cyclic nucleotides
in: Methods in Enzymology XXXVIII, Seite 399-409; Hrsg: Hardman, J.G., O'Malley, B.W.; Academic Press, New York (1974)

249. Puurunen, J., Karppanen, H.: Effects of ethanol on gastric acid secretion and gastric mucosal cyclic AMP in the rat
Life Sciences 16,1513-20 (1975)

250. Puurunen, J., Hiltunen, K., Karppanen, H.: Ethanol-induced changes in gastric mucosal content of cyclic AMP and ATP in the rat
Eur. J. Pharmacol. 42,85-9 (1977)

251. Puurunen, J., Karppanen, H., Kairaluoma, M., Larmi, T.: Effects of ethanol on the cyclic AMP system of the dog gastric mucosa
Eur. J. Pharmacol. 38,275-9 (1976)

252. Puurunen, J.: Studies on the mechanism of the inhibitory effect of ethanol on the gastric acid output in the rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303,87-93 (1978)

253. Puurunen, J., Lücke, C., Schwabe, U.: Effect of the phosphodiesterase inhibitor 4-(3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711) on gastric secretion and gastric mucosal cyclic AMP
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304,69-75 (1978)

254. Rabinowitz, B., Katz, J.: Method for determination of cyclic AMP in plasma
Clin. Chem. 19,312-4 (1973)

255. Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J.: The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. The effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenate
J. Biol. Chem. 224,463-75 (1957)

256. Ray, T.K., Forte, J.G.: Studies on phosphodiesterase from oxyntic cells of bullfrog gastric mucosa. I. Intracellular localization, partial purification, and properties
Arch. Biochem. Biophys. 155,24-31 (1973)

257. Ray, T.K., Forte, J.G.: Studies on the adenylate cyclase and cyclic AMP phosphodiesterase of the bullfrog oxyntic cells
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 335-46; Hrsg: Bonfils et al.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

258. Ray, T.K., Forte, J.G.: Adenyl cyclase of oxyntic cells. Its association with different cellular membranes
Biochim. Biophys. Acta 320,320-39 (1974)

259. Reed, J.D., Wagstaff, M.J., Hirst, B.H.: Humoral inhibition and stimulation of isolated rat gastric mucosal cell measured by their O_2 uptake
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 408; Hrsg: Bonfils et al.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

260. Reyl, F.J., Silve, C., Lewin, M.J.M.: Somatostatin receptors on isolated gastric cells
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 391-400; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

261. Reyl, F.J., Lewin, M.J.M.: Intracellular receptor for somatostatin in gastric mucosal cells: Decomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatases
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,978-82 (1982)

262. Richman, R.A., Kopf, G.S., Hamet, P., Johnson, R.A.: Preparation of cyclic nucleotide antisera with thyroglobulin-cyclic nucleotide conjugates
J. Cycl. Nucl. Res. 6,461-9 (1980)

263. Robert, A.: Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins
in: Advances in Prostaglandin and Thromboxan Research 2, Seite 507-20; Hrsg: Samuelsson, P., Paoletti, R.; Raven Press, New York (1976)

264. Roberson, G.M., Barnes, L.D.: Separation of cyclic AMP and cyclic GMP from thymidine, electrolytes and polyvalent nucleotides in tissue samples
Biochim. Biophys. Acta 544,20-28 (1978)

265. Robert, A.: Prostaglandins and the gastrointestinal tract
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 1407-34; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

266. Rosenfeld, G.C., Strada, S.J., Dial, E.J., Bearer, C.F., Thompson, W.J.: Histamine, cyclic nucleotides, and gastric parietal cell secretion
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 12, Seite 255-66; Hrsg: Hamet, P., Sands, H.; Raven Press, New York (1980)

267. Rosenfeld, G.C., Mc Allister, E., Thompson, W.J.: Cytochalasin inhibition of isolated rat gastric parietal cell function
J. Cell. Physiol. 109,53-7 (1981)

268. Rosenfeld, G.C.: Pirenzepine (LS 519): A weak inhibitor of acid secretion by isolated rat parietal cells
Eur. J. Pharmacol. 86,99-101 (1983)

269. Roux, D., Delaage, M.A., Cailla, H.L.: Saturation of anti cyclic nucleotides antibodies by endogenous cyclic nucleotides
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90,667-73 (1979)

270. Rubin, W., Schwartz, B.: Electron microscopic radioautographic identification of the ECL cell as the histamine-synthesizing endocrine cell in the rat stomach
Gastroenterology 77,458-67 (1979)

271. Ruoff, H.-J.: Cyclic AMP and cyclic GMP in the rat gastric mucosa. The significance of post mortem changes and tissue fixation on the estimation of the in vivo level
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298,167-73 (1977)

272. Ruoff, H.-J., Wagner, M., Günther, C., Maslinski, S.: Adrenergic stimulation of isolated rat gastric mucosal cells. Effect on adenylate cyclase and ^{14}C-aminopyrine uptake
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 320,175-81 (1982)

273. Ruoff, H.-J.: General discussion 2
in: Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract, Seite 197-99; Hrsg: Case, R.M., Goebell, H.; MTP Press, St. Leonards House (1976)

274. Ruoff, H.-J., Sewing, K.-F.: Influence of atropine, metiamide and vagotomy on cAMP of resting and stimulated gastric mucosa
Eur. J. Pharmacol. 32,227-32 (1975)

275. Ruoff, H.-J., Sewing, K.-F.: Rat gastric mucosal cAMP following cholinergic and histamine stimulation
Eur. J. Pharmacol. 28,338-43 (1974)

276. Ruoff, H.-J.: Rat gastric mucosal cAMP and cGMP after adrenergic stimulation and blockade
Eur. J. Pharmacol. 44,349-54 (1977)

277. Ruoff, H.-J., Painz, B., Gladziwa, U., Becker, M., Sewing, K.-F., Malchow, H.: Adrenaline sensitive adenylate cyclase in human gastric mucosa
Pharmacology 23,137-44 (1981)

278. Ruoff, H.-J.: Effect of cholinergic mechanisms on rat gastric mucosal cAMP - Abstract
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282,Suppl R82 (1974)

279. Ruoff, H.-J., Sewing, K.-F.: Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) in the rat gastric mucosa after pentagastrin, histamine and carbachol - Abstract
Acta Hepato-Gastroenterol. 20,172-3 (1973)

280. Ruoff, H.-J., Becker, M., Painz, B., Rack, M., Sewing, K.-F., Malchow, H.: Human gastric mucosal adenylate cyclase: Activation by histamine-H_2-receptor stimulation and inhibition by cimetidine in vitro and in peptic ulcer patients
Eur. J. Clin. Pharmacol. 15,147-51 (1979)

281. Ruoff, H.-J., Lippert, T. H., Seeger, H., Voelter, W.: Immunoreactive relaxin-like substance and relaxin sensitive adenylate cyclase in the gastric mucosa
IRCS Med. Sci. 12,224-5 (1984)

282. Rutten, M.J., Machen, T.E.: Histamine, cyclic AMP, and activation events in piglet gastric mucosa in vitro
Gastroenterology 80,923-37 (1981)

283. Rutten, M.J., Soll, A.H.: Hormone regulation of parietal cell function: Gastrin interaction with a specific receptor
Ann. N. Y. Acad. Sci. 372,637-42 (1981)

284. Sachs, G., Berglindh, T., Rabon, E., Wallmark, B., Barcellona, M.L., Stewart, H.B., Saccomani, G.: The interaction of K^+ with gastric parietal cells and gastric ATPase
Ann. N. Y. Acad. Sci. 358,118-37 (1980)

285. Sachs, G., Rabon, E., Helander, H.F., Ito, S., Dibona, D.R., Saccomani, G., Berglindh, T.: Role of K^+ in parietal cell biology
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 327-36; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

286. Sachs, G., Berglindh, T.: Physiology of the parietal cell
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 567-602; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

287. Salganik, R.I., Argutinskaya, S.V., Bersimbaev, R.I.: The stimulating action of gastrin pentapeptide, histamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on carbonic anhydrase in rat stomach
Experientia 28,1190-1 (1972)

288. Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M.: A highly sensitive adenylate cyclase assay
Anal. Biochem. 58,541-8 (1974)

289. Salomon, Y.: Adenylate cyclase assay
in: Advances in Cyclic Nucleotide Research 10, Seite 35-55; Hrsg: Brooker, G., Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York (1979)

290. Sanborn, B.M., Kuo, H.S., Weisbrodt, N.W., Sherwood, O.D.: The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity
Endocrinology 106,1210-5 (1980)

291. Sanborn, B.M., Kuo, H.S., Weisbrodt, N.W., Sherwood, O.D.: Effect of porcine relaxin on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractions in the rat uterus
Exp. Med. Biol. 143,273-83 (1982)

292. Sato, K., Miyachi, Y., Mizuchi, A., Ohsawa, N., Kosaka, K.: Enzymatic radiojodination of succinyl cyclic AMP tyrosine methyl ester by lactoperoxidase and radioimmunoassay for cyclic AMP
Endocrinol. Jpn. 23,251-7 (1976)

293. Schepp, W., Heim, H.-K., Ruoff, H.-J.: Comparison of the effect of PGE_2 and somatostatin on histamine stimulated ^{14}C-aminopyrine uptake and cyclic AMP formation in isolated rat gastric mucosal cells
Agents and Actions 13,200-6 (1983)

294. Schepp, W., Ruoff, H.-J., Maslinski, S.: Aminopyrine accumulation of isolated parietal cells from the rat stomach. Effect of histamine and interaction with endogenous inhibitors
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 265,293-307 (1983)

295. Schepp, W., Ruoff, H.-J.: Adenylate cyclase and H^+ production of isolated rat parietal cells in response to glucagon and histamine
Eur. J. Pharmacol. 98,9-18 (1984)

296. Schepp, W., Ruoff, H.-J., Miederer, S.E.: Cellular origin and release of intrinsic factor from isolated rat gastric mucosal cells
Biochim. Biophys. Acta 763,426-33 (1983)

297. Schepp, W., Miederer, S.E., Ruoff, H.-J.: Intrinsic factor secretion from isolated human gastric mucosal cells
Biochim. Biophys. Acta 804,192-9 (1984)

298. Schepp, W., Miederer, S.E., Ruoff, H.-J.: Intrinsic factor secretion from isolated gastric mucosal cells of rat and man - two different patterns of secretagogue control
Agents and Actions 14,522-8 (1984)

299. Scholes, P., Cooper, A., Jones, D., Major, M., Walters, M., Wilde, C.: Characterization of an adenylate cyclase system sensitive to histamine H_2-receptor excitation in cells from dog gastric mucosa
Agents and Actions 6,677-82 (1976)

300. Schultz, G., Böhme, E., Munske, L.: Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity
Life Sciences 8,1323-32 (1969)

301. Schultz, G., Jakobs, K.H., Hofmann, F.: Wirkungsprinzipien von Hormonen und Neurotransmittern
Arzneim. Forsch./Drug Res. 30,1981-6 (1980)

302. Schwartzel, E.H., Bachman, S., Levine, R.A.: Cyclic nucleotide activity in gastrointestinal tissues and fluids
Anal. Biochem. 78,395-405 (1977)

303. Schwabe, U., Ebert, R., Schönhöfer, P.S.: Sensitive determination for adenylate cyclase activity by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate protein binding assay
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286,83-96 (1974)

304. Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W.: Forskolin: A unique diterpene activator of cyclic-AMP generating systems
J. Cycl. Nucl. Res. 7,201-24 (1981)

305. Seamon, K.B., Daly, J.W.: Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein
J. Biol. Chem. 256,9799-801 (1981)

306. Serva, Feinbiochemika für Forschung: Serva Feinbiochemica GmbH+Co, 6900 Heidelberg 1 (1982)

307. Sewing, K.-F., Harms, P., Schulz, G., Hannemann, H.: Effect of substituted benzimidazoles on acid secretion in isolated and enriched guinea pig parietal cells
Gut 24,557-60 (1983)

308. Sewing, K.-F., Hannemann, H.: Calcium channel antagonists verapamil and gallopamil are powerful inhibitors of acid secretion in isolated and enriched guinea pig parietal cells
Pharmacology 27,9-14 (1983)

309. Shearin, N.L., Pancoe, W.L.: Effect of prostaglandin E_1 on rat gastric motility and cyclic nucleotide content
Experientia 32,1553-4 (1976)

310. Shen, T.- Y., Winter, C.A.: Chemical and biological studies on indometacin, sulindac and their analogs
Adv. Drug Res. 12,90-245 (1977)

311. Simon, B., Czygan, P., Fröhling, W., Kather, H.: Topographical studies on histamine- and adrenaline-sensitive adenylate cyclase in gastric and duodenal mucosa of human beings
Digestion 16,185-8 (1977)

312. Simon, B., Kather, H.: Adenylate cyclase of human gastric mucosa. Stimulation of enzyme activity by histamine and catecholamines
Digestion 16,175-9 (1977)

313. Simon, B., Kather, H.: Prostaglandin-sensitive adenylate cyclase in human gastric mucosa. Inhibition by nonsteroid antiinflammatory agents
Pharmacology 19,96-103 (1979)

314. Simon, B., Kather, H.: Human gastric mucosal adenylate cyclase. Modulation of enzyme activity by histamine, vasoactive intestinal peptide and prostaglandins
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 419-29; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

315. Simon, B., Kather, H.: Activation of human adenylate cyclase in the upper gastrointestinal tract by vasoactive intestinal polypeptide
Gastroenterology 74,722-5 (1978)

316. Simon, B., Kather, H.: Modulation of human gastric mucosal adenylate cyclase activity by prostacyclin
Digestion 19,137-9 (1979)

317. Simon, B., Kather, H., Kommerell, B.: Effects of prostaglandins and their methylated analogues upon human adenylate cyclase in the upper gastrointestinal tract
Digestion 17,547-53 (1978)

318. Simon, B., Kather, H.: Adenylate cyclase of human gastric mucosa. Stimulation by prostaglandins
Res. Exp. Med. (Berlin) 173,113-7 (1978)

319. Skoglund, M.L., Nies, A.S., Gerber, J.G.: Inhibition of acid secretion in isolated canine parietal cells by prostaglandins
J. Pharm. Exp. Ther. 220,371-4 (1982)

320. Skoglund, M.L., Gerber, J.G., Murphy, R.C., Nies, A.S.: Prostaglandin production by intact isolated gastric parietal cells
Eur. J. Pharmacol. 66,145-8 (1980)

321. Skomedal, T., Grynne, B., Osnes, J.B., Sjetnan, A.E., Øye, I.: A radioimmunoassay for cyclic AMP (cAMP) obtained by acetylation of both unlabeled and labeled (^{3}H-cAMP) ligand, or of unlabeled ligand only
Acta Pharmacol. Toxicol. 46,200-4 (1981)

322. Sokolowski, G., Wood, W.G.: Herstellung eines Immunogens: Kopplung an Trägerproteine
in: Radioimmunoassay in Theorie und Praxis, Seite 77-8; Hrsg: Sokolowski, G., Wood, W.G.; Schnetztor Verlag, Konstanz (1981)

323. Sokolowski, G., Wood, W.G.: Qualitätssicherung im RIA-Labor: Anlage und Interpretation von Kontrollkarten
in: Radioimmunoassay in Theorie und Praxis, Seite 159-65; Hrsg: Sokolowski, G., Wood, W.G.; Schnetztor Verlag, Konstanz (1981)

324. Sokolowski, G., Wood, W.G.: Radioimmunoassay in Theorie und Praxis. Ein Laborbuch für Anfänger und Fortgeschrittene
Schnetztor Verlag, Konstanz (1980)

325. Soll, A.H., Wollin, A.: Histamine and cyclic AMP in isolated canine parietal cells
Am. J. Physiol. 237,E444-50 (1979)

326. Soll, A.H.: Specific inhibition by prostaglandins E_2 and I_2 of histamine-stimulated [^{14}C]aminopyrine accumulation and cyclic adenosine monophosphate generation by isolated canine parietal cells
J. Clin. Inv. 65,1222-9 (1980)

327. Soll, A.H., Whittle, B.J.R.: Activity of prostacyclin, a stable analogue 6ß-PGI_1 and 6-oxo-PGF_1 on canine isolated parietal cells
Br. J. Pharmacol. 66,97P-98P (1979)

328. Soll, A.H., Whittle, B.J.R.: Prostacyclin analogues inhibit canine parietal cell activity and cyclic AMP formation
Prostaglandins 21,353-65 (1981)

329. Soll, A.H.: Physiology of isolated canine parietal cells: Receptors and effectors regulating function
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract, Seite 673-91; Hrsg: Johnson, L.R.; Raven Press, New York (1981)

330. Soll, A.H., Lewin, K.J., Beaven, M.A.: Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: Biochemical and morphologic differences from mast cells
Gastroenterology 80,17-27 (1981)

331. Soll, A.H.: Hormonal control of parietal cell function
World J. Surg. 3,441-7 (1979)

332. Soll, A.H.: Studies on the actions and interactions of secretagogues on isolated mammalian parietal cells as reflected in changes in oxygen consumption and aminopyrine uptake
Gastroenterology 73,899 (1979)

333. Soll, A.H.: Potentiating interactions of gastric stimulants on [^{14}C]aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells
Gastroenterology 83,216-23 (1982)

334. Soll, A.H.: Secretagogue stimulation of [^{14}C]aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells
Am. J. Physiol. 238,G366-75 (1980)

335. Soll, A.H.: The actions of secretagogues on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells
J. Clin. Invest. 61,370-80 (1978)

336. Soll, A.H., Whittle, B.J.R.: Interaction between prostaglandins and cyclic AMP in the gastric mucosa
Prostaglandins 21,Suppl39-45 (1981)

337. Soll, A.H.: The interaction of histamine with gastrin and carbamylcholine on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells
J. Clin. Invest. 61,381-9 (1978)

338. Soll, A.H.: The physiology of the isolated mammalian parietal cell: Actions and interactions of secretagogues
in: First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Seite 406-7; Hrsg: Bonfils et al; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

339. Soll, A.H.: Extracellular calcium and cholinergic stimulation of isolated canine parietal cells
J. Clin. Invest. 68,270-8 (1981)

340. Soll, A.H., Grossman, M.I.: The interaction of stimulants on the function of isolated canine parietal cells
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 296,5-15 (1981)

341. Sonnenberg, A., Berglindh, T., Lewin, M.J.M., Fisher, J.A., Sachs, G., Blum, A.L.: Stimulation of acid secretion in isolated gastric cells
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 337-48; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

342. Sonnenberg, A., Hunziker, W., Koelz, H.R., Fischer, J.A., Blum, A.L.: Stimulation of endogenous cyclic AMP (cAMP) in isolated gastric cells by histamine and prostaglandin
Acta Physiol. Scand. Spec. Suppl. 307-17 (1978)

343. Soumarmon, A., Ghesquier, D., Lewin, M.J.M.: Cl^- transport by gastric microsomes and isolated cells: HCO_3^- and ATP dependence, histamine stimulation
in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, Seite 349-54; Hrsg: Rosselin, G., Fromageot, P., Bonfils, S.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979)

344. Soumarmon, A., Cheret, A.M., Lewin, M.J.M.: Localization of gastrin receptors in intact isolated and separated rat fundic cells
Gastroenterology 73,900-3 (1977)

345. Steiner, A.L., Kipnis, D.M., Utiger, R., Parker, C.: Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64,367-73 (1969)

346. Steiner, A.L., Parker, C.W., Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides
J. Biol. Chem. 247,1106-13 (1972)

347. Steiner, A.L.: Assay of cyclic nucleotides by radioimmunoassay methods
in: Methods of Enzymology XXXVIII, Seite 96-104; Hrsg: Hardman, J.C., O'Malley, B.W.; Academic Press, New York (1974)

348. Stragand, J.J., Hagemann, R.F.: A technical improvement in the radioimmunoassay of cyclic-AMP
Experientia 31,1375-6 (1975)

349. Struck, C.J., Ahnert, G., Glossmann, H., Schaeg, W.: Solid phase radioimmunoassay for cyclic AMP using staphylococcal protein A-antibody adsorbent
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298,67-73 (1977)

350. Sung, C.P., Wiebelhaus, V.D., Jenkins, B.C., Adlercreutz, P., Hirschowitz, B.I., Sachs, G.: Heterogeneity of 3',5'-phosphodiesterase of gastric mucosa
Am. J. Physiol. 223,648-50 (1972)

351. Sung, C.P., Jenkins, B.C., Burns, L.R., Hackney, V., Spenney, J.G., Sachs, G., Wiebelhaus, V.D.: Adenyl and guanyl cyclase in rabbit gastric mucosa
Am. J. Physiol. 225,1359-63 (1973)

352. Sutherland, E.W., Robison, G.A.: Metabolic effects of catecholamines
Pharmacol. Rev. 18,145-61 (1966)

353. Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T.: Adenyl cyclase I. Distribution, preparation and properties
J. Biol. Chem. 237,1220-7 (1962)

354. Szabo, S., Trier, J.S., Trankel, P.W.: Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection
Science 214,200-2 (1981)

355. Tague, L.L., Shanbour, L.L.: Effects of ethanol on gastric mucosal adenosine 3',5' monophosphate (cAMP)
Life Sciences 14,1065-73 (1974)

356. Takakura, J.: Gastric disease and cyclic nucleotides I. Micro-assay of cyclic nucleotides in rat stomach
Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi 77,1539-46 (1980)

357. Takeuchi, K., Speir, G.R., Johnson, L.R.: Mucosal gastrin receptor. I. Assay standardization and fulfillment of receptor criteria
Am. J. Physiol. 237,E284-94 (1979)

358. Takeuchi, K., Speir, G.R., Johnson, L.R.: Mucosal gastrin receptor. III. Regulation by gastrin
Am. J. Physiol. 238,G135-40 (1980)

359. Takeuchi, K., Speir, G.R., Johnson, L.R.: Mucosal gastrin receptor. II. Physical characteristics of binding
Am. J. Physiol. 237,E295-300 (1979)

360. Talev, J.N.: Cyclic GMP and cyclic AMP in stimulated human and canine gastric mucosa and juice: Evidence against their regulatory role in gastric acid secretion - Abstract
Gastroenterology 70,940 (1976)

361. Tani, S., Mutoh, N.: Effects of adrenergic agonists on gastric secretion in the rat
Biochem. Pharmacol. 28,678-83 (1979)

362. Tao, P., Holian, O., Wilson, D.E.: Histamine and prostaglandin interactions with the cyclic-AMP system during canine gastric secretion - Abstract
Gastroenterology 70,941 (1976)

363. Tepperman, B.L., Soper, B.D.: Prostaglandin E_2-binding sites and cAMP production in porcine fundic mucosa
Am. J. Physiol. 241,G313-20 (1981)

364. Terano, A., Ivey, K.J., Stachura, J., Sekhon, S., Hosojima, H., McKenzie, W.N., Krause, W.J., Wyche, J.H.: Cell culture of rat gastric fundic mucosa
Gastroenterology 83,1280-91 (1982)

365. Thompson, W.J., Chang, L.K., Rosenfeld, G.C.: Histamine regulation of adenylyl cyclase of enriched rat gastric parietal cells
Am. J. Physiol. 240,G76-84 (1981)

366. Thompson, W.J., Rosenfeld, G.C., Jacobson, E.D.: Adenylyl cyclase and gastric acid secretion
Fed. Proc. 36,1938-41 (1977)

367. Thompson, W.J., Chang, L.K., Rosenfeld, G.C., Jacobson, E.D.: Activation of rat gastric mucosal adenylyl cyclase by secretory inhibitors
Gastroenterology 72,251-4 (1977)

368. Thompson, W.J., Chang, L.K., Jacobson, E.D.: Rat gastric mucosal adenylyl cyclase
Gastroenterology 72,244-50 (1977)

369. Thompson, W.J., Jacobson, E.D., Rosenfeld, G.C.: A role of cyclic AMP in the gastrointestinal tract: Receptor control of hydrogen ion secretion by mammalian gastric mucosa
in: Handbook of Experimental Pharmacology 58/2, Seite 651-82; Hrsg: Kebabian, J.W., Nathanson, J.A.; Springer Verlag, Berlin (1982)

370. Thurston, D., Tao, P., Wilson, D.E.: Cyclic nucleotides and the regulation of canine gastric acid secretion
Dig. Dis. Sci. 24,257-64 (1979)

371. Thurston, D., Tao, P., Wilson, D.E.: Relationships between cyclic nucleotides and prostaglandin action on canine gastric secretion - Abstract
Clin. Res. 24,538A (1976)

372. Torikai, S., Imai, M.: A simple method to determine adenylate cyclase activity in isolated single nephron segments by radioimmunoassay for succinyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
Tohoku J. Exp. Med. 129,91-9 (1979)

373. Tsai, B.S., Yellin, T.O.: Regulation by monovalente cations of histamine H_2 receptor-coupled adenylate cyclase from guinea pig fundic gastric mucosa
Life Sciences 33,895-902 (1983)

374. Valenzuela, J.E., Defilippi, C., Diaz, G., Navia, E., Merino, Y.: Effect of dopamine on human gastric and pancreatic secretion
Gastroenterology 76,323-6 (1979)

375. Vesely, D.L., Meiners, S.E.: Cimetidine partially blocks gastrin's activation of gastric mucosal guanylate cyclase
Endocrinology 112,1925-9 (1983)

376. Vesely, D.L., Levey, G.S.: Ethanol-induced inhibition of guanylate cyclase in liver, pancreas, stomach and intestine
Res. Commun. Chem. Path. Pharm. 17,215-23 (1977)

377. Vidal y Plana, B.R., Cifarelli, A., Bizarri, D.: Effects of antigastrin-drugs on the interaction of ^{125}I-human gastrin with rat gastric mucosa membranes
Hepato- Gastoent. 27,41 (1980)

378. Volfin, P., Hanoune, J.: Effects of insulin on nucleic acids, nucleotides and cyclic AMP
in: Handbook of Experimental Pharmacology XXXII/2, Seite 303-27; Hrsg: Hasselblatt, A., v. Bruchhausen, F.; Springer Verlag, Berlin (1975)

379. Volicer, L., Gold, B.I.: Interactions of ethanol with cyclic AMP
in: Biochemical Pharmacology of Ethanol, Seite 211-37; Hrsg: Maychrowicz, E.; Plenum Press, New York (1975)

380. Vossenberg, J., Mulder, G., Thijsen, J.: Comparison of four commercially available cAMP kits
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17,581-5 (1979)

381. Wallmark, B., Jaresten, B.-M., Larsson, H., Ryberg, B., Brandström, A., Fellenius, E.: Differentiation among inhibitory actions of omeprazole, cimetidine, and SCN^- on gastric acid secretion
Am. J. Physiol. 245,G64-71 (1983)

382. Wehmann, R.E., Blonde, L., Steiner, A.L.: Simultaneous radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate
Endocrinology 90,330-5 (1972)

383. Weinryb, I., Michel, I.M., Hess, S.M.: Radioimmunoassay of cyclic AMP without precipitating antibody
Anal. Biochem. 45,659-63 (1972)

384. White, A.A., Zenser, T.V.: Separation of cyclic 3',5'-nucleotide monophosphates from other nucleotides on aluminium oxide columns
Anal. Biochem. 41,372-96 (1971)

385. White, A.A.: Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography
in: Methods in Enzymology XXXVIII, Seite 41-6; Hrsg: Hardman, J.G., O'Malley, B.W.; Academic Press, New York (1974)

386. White, A.A., Karr, D.B.: Improved two-step method for the assay of adenylate and guanylate cyclase
Anal. Biochem. 85,451-60 (1978)

387. White, A.A., Aurbach, G.D.: Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues
Biochim. Biophys. Acta 191,686-97 (1969)

388. Wollin, A., Soll, A.H., Samloff, I.M.: Actions of histamine, secretin, and PGE_2 on cyclic AMP production by isolated canine fundic mucosal cells
Am. J. Physiol. 237,E437-43 (1979)

389. Wollin, A., Code, C.F., Dousa, T.P.: Interaction of prostaglandins and histamine with enzymes of cyclic AMP metabolism from guinea pig gastric mucosa
J. Clin. Invest. 57,1548-53 (1976)

390. Wood, P.J., Marks, V.: Direct measurement of cGMP in blood plasma and urine by radioimmunoassay
Annals of Clin. Biochem. 15,25-30 (1978)

391. Young, J.L., Stansfield, D.A.: Use of a competitive protein-binding assay for adenosine 3',5'-phosphate for the study of bovine corpus luteum adenylate cyclase
J. Endocrinol. 73,123-34 (1977)

392. Zarrindast, M.R., Shargi, C., Gerayesh-Nejad, S., Djahanguiri, B.: Cyclic AMP and cyclic GMP levels in glandular stomach of restrained rats
Res. Commun. Chem. Path. Pharm. 18,373-6 (1977)

393. Zimmerman, T.P., Winston, M.S., Chu, L.-C.: A more sensitive radioimmunoassay (RIA) for guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) involving prior 2'-O-succinylation of samples
Anal. Biochem. 71,79-95 (1976)

394. Zucker, K., Nelson, C., Greenburg, A.G., Peskin, G.W., Stefanko, J., Saik, R.P.: Isolation of viable enriched suspension of parietal cells
J. Surg. Res. 33,489-94 (1982)

Lebenslauf

Hans-Karl Heim

Geburtstag: 14. August 1956
Geburtsort: Weil im Schönbuch / Baden-Württemberg

Schulischer Werdegang

1963 - 1966: Besuch der Grundschule in Weil im Schönbuch
1966 - 1969: Besuch des Albert-Einstein-Gymnasiums in Böblingen / Baden-Württemberg
1970 - 1975: Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in Böblingen. Erfolgreiche Ablegung der Reifeprüfung am 31. Mai 1975

Beruflicher Werdegang

1975 - 1979: Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen von September 1975 bis März 1979
1977: Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 8. September
1979: Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 19. März
Pharmaziepraktikum in der Flora Apotheke in Weil im Schönbuch von Mai bis November
Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. H.- J. Ruoff am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen im Dezember
1980: Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker am 30. Mai
1981: Erfolgreiche Teilnahme am Kurs "Fachkunde beim Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen in C-Laboratorien und mit umschlossenen radioaktiven Stoffen bis zum 100-fachen der Freigrenzen" vom 6. bis 10. April
1984: Abschluß der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Juli

Meine akademischen Lehrer waren außer Herrn Prof. Dr. H.-J. Ruoff die folgenden Professoren:

- Pharmazeutische Chemie: H. Auterhoff, J. Schultz, K.-A. Kovar
- Pharmazeutische Technologie: E. Graf, H. Hamacher
- Pharmazeutische Biologie: E. Reinhardt
- Pharmakologie für Naturwissenschaftler: H.P.T. Ammon
- Medizinische Mikrobiologie: R.E. Bader

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353